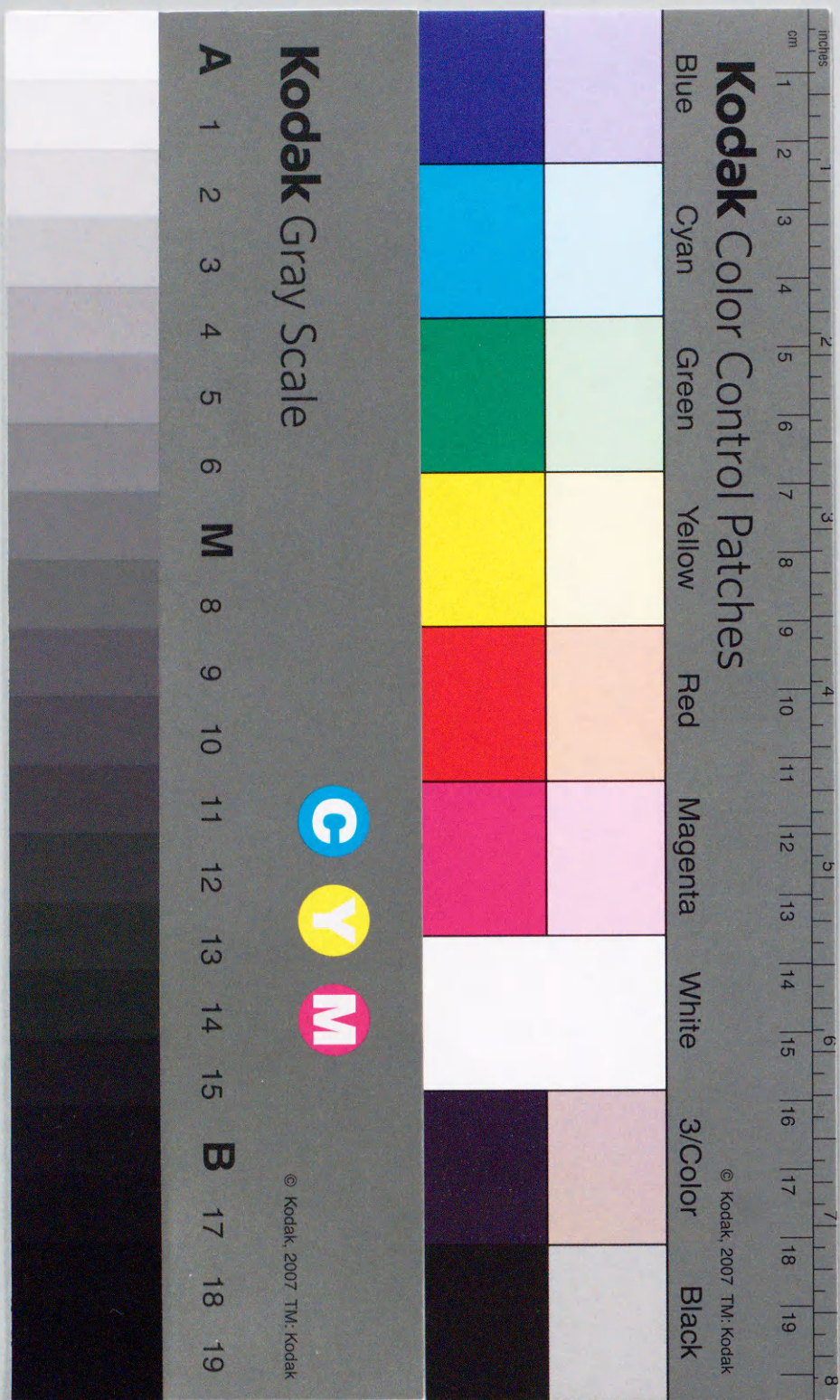


生薬「升麻」から得られる生物活性成分に関する研究

著者	高平 正行
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54313

生薬「升麻」から得られる生物活性成分
に関する研究

高平正行



生薬「升麻」から得られる生物活性成分 に関する研究

高 平 正 行

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. **Three New Fukiic Acid Esters, Cimicifugic Acids A, B and C, from *Cimicifuga Simplex* WORMSK**

Masayuki TAKAHIRA, Akiko KUSANO, Makio SHIBANO, Genjiro KUSANO, Nobuko SAKURAI, Masahiro NAGAI and Toshio MIYASE, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 362–365 (1998).

2. **Piscidic Acid and Fukiic Acid Esters from *Cimicifuga Simplex***

Masayuki TAKAHIRA, Akiko KUSANO, Makio SHIBANO, Genjiro KUSANO and Toshio MIYASE, *Phytochemistry*, **49**, 2115–2119 (1998).

3. **Phenolic Constituents of *Cimicifuga* Species Rhizomes**

Masayuki TAKAHIRA, Masakazu YANAGI, Akiko KUSANO, Makio SHIBANO, Kimie BABA, Genjiro KUSANO, Nobuko SAKURAI and Masahiro NAGAI, *Natural Medicines*, **52**, 330–338 (1998).

4. **Vasoactive Effects of Cimicifugic Acids C and D, and Fukinolic Acid in *Cimicifuga* Rhizome**

Mariko NOGUCHI, Masahiro NAGAI, Mamoru KOEDA, Shigeki NAKAYAMA, Nobuko SAKURAI, Masayuki TAKAHIRA and Genjiro KUSANO, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163–1168 (1998).

5. **Studies on Inhibitory Activities of Fukiic Acid Esters on Germination, α -Amylase and Carboxypeptidase A**

Genjiro KUSANO, Masayuki TAKAHIRA, Makio SHIBANO, Akiko KUSANO, Yukiko OKAMOTO, Hiroshi TSUJIBO, Atsushi NUMATA and Yoshihiko INAMORI, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 997–999 (1998).

6. **Antimalarial Activity and Nucleoside Transport Inhibitory Activity of the**

Triterpenic Constituents of *Cimicifuga* spp.

Masayuki TAKAHIRA, Akiko KUSANO, Makio SHIBANO, Genjiro KUSANO, Kenzo KOIZUMI, Ryuji SUZUKI, Hye-Sook KIM and Yusuke WATAYA, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 823-828 (1998).

目次

総論の部

第一章 緒言	1
第二章 サラシナショウマ地下部からの生物活性成分の単離	
第一節 生物活性成分の単離	7
第二節 水溶性芳香族成分の HPLC による精製法	8
第三節 小結	9
第三章 芳香族カルボン酸類およびエステル化合物の構造 (化合物 1-26)	
第一節 3 種の新規 fukiic acid エステル (cimicifugic acid A, B, C) の構造決定および fukinolic acid の同定	11
第二節 3 種の新規 piscidic acid エステル (cimicifugic acid D, E, F) および 4 種の新規モノメチルエステルの構造	17
第三節 その他の水溶性芳香族成分の単離と構造	24
第四節 化合物 1-19, 24 および 25 の生合成経路についての考察	26
第五節 小結	28
第四章 6 種のショウマ (<i>Cimicifuga</i>) 属植物に含まれる水溶性芳香族成分	
第一節 <i>Cimicifuga</i> 属植物の 23 種の水溶性芳香族成分	30
第二節 芳香族成分の比較	31
第三節 小結	32
第五章 Cimicifugic acid および関連化合物の大動脈血管平滑筋に対する作用	
第一節 大動脈血管平滑筋に対する作用およびその作用機序	37
第二節 構造活性相関	46
第三節 小結	47
第六章 Cimicifugic acid A, fukinolic acid の発芽抑制作用および α -amylase と carboxypeptidase A に対する阻害活性	

第一節 発芽抑制作用 -----	49
第二節 α -Amylase および carboxypeptidase A に対する阻害活性 -----	51
第三節 小結 -----	53
第七章 サラシナショウマ属植物から得られるトリテルペノイドの抗マラリア 原虫活性とヌクレオシド取り込み阻害活性 -----	
第一節 抗マラリア原虫活性 -----	54
第二節 ヌクレオシド取り込み阻害活性 -----	58
第三節 ヌクレオシド取り込み阻害と抗マラリア原虫活性の関係 -----	59
第四節 小結 -----	61
第八章 結論 -----	63
謝辞 -----	66

実験の部

第一節 第二章に関する実験 -----	67
第二節 第三章に関する実験 -----	71
第三節 第四章に関する実験 -----	80
第四節 第五章に関する実験 -----	82
第五節 第六章に関する実験 -----	84
第六節 第七章に関する実験 -----	85
参考文献 -----	90 - 94

本論文において、以下の略記を用いた。

$[\alpha]_D$: specific optical rotation (比旋光度)
COSY	: correlation spectroscopy (相関スペクトル)
SIMS	: secondary ion mass spectrometry (二次イオン質量分析)
m/z $[M]^+$: molecular ion, parent ion (分子イオン, 親イオン)
HR	: high resolution (高分解能)
ROESY	: rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy
ROE	: rotating-frame Overhauser enhancement
NMR	: nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
IR	: infrared (赤外)
HPLC	: high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
Fr.	: fraction (画分)
TLC	: thin layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)
t_R	: retention time (保持時間)
R_f	: rate of flow (移動比)
sh	: shoulder (肩)
UV	: ultraviolet (紫外)
min	: minute (分)
l	: liter (リットル)
ml	: milliliter (ミリリットル)
M	: molar (モル濃度)
S.E.	: standard error (標準誤差)
S.D.	: standard deviation (標準偏差)
p	: probability (確率)
cd/cm ²	: candela per square meter (カンデラ / 平方メートル)
mp	: melting point (融点)
ACh	: acetylcholine (アセチルコリン)
Ar	: aryl (芳香族) 基
Ac	: acetyl (アセチル) 基
Me	: methyl (メチル) 基

AcOH	: acetic acid (酢酸)
EtOAc	: ethyl acetate (酢酸エチル)
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol (ノルマルブタノール)
MeCN	: acetonitrile (アセトニトリル)
CHCl ₃	: chloroform (クロロホルム)
CDCl ₃	: chloroform- <i>d</i> (重クロロホルム)
MeOH	: methanol (メタノール)
CD ₃ OD	: methanol- <i>d</i> (重メタノール)
D ₂ O	: deuterated water (重水)
DMSO	: dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
HCl	: hydrochloric acid (塩酸)
NaOH	: sodium hydroxide (水酸化ナトリウム)
H ₂ SO ₄	: sulfuric acid (硫酸)
FeCl ₃	: iron (III) chloride (塩化第二鉄)
Mg ₂ SO ₄	: magnesium sulfate (硫酸マグネシウム)
<i>p</i> -TsOH	: <i>p</i> -toluenesulfonic acid (パラトルエンスルホン酸)
CrO ₃	: chromium oxide (酸化クロム)
NaCl	: sodium chloride (塩化ナトリウム)
KCl	: potassium chloride (塩化カリウム)
NaHCO ₃	: sodium hydrogencarbonate (炭酸水素ナトリウム)
CaCl ₂	: calcium chloride (塩化カルシウム)
NaH ₂ PO ₄	: sodium dihydrogenphosphate (リン酸二水素ナトリウム)

総 論 の 部

第一章 緒言

1. はじめに

第十三改正日本薬局方第1追補では、ショウマ（升麻）について、「本品はサラシナショウマ *Cimicifuga* (C.) *simplex* Wormskjold, *C. dahurica* (Turcz.) Maximowicz, *C. foetida* Linné 又は *C. heracleifolia* Komarov (Ranunculaceae) の根茎である」と規定されており¹⁾、これらは漢方薬の配合薬として利用される。サラシナショウマ *Cimicifuga* 属植物はキンポウゲ科 (Ranunculaceae) に属する多年草で、そのうち数種の根茎が薬用に供されている。サラシナショウマ *C. simplex* Wormskjold は、日本の北海道、本州、四国、九州などに分布しており山地の木陰や草原に自生する (Fig. 1)。我が国では、サラシナショウマ以外に同属植物としてイヌショウマ *C. japonica* (Thunb.) Sprengel とオオバショウマ *C. acerina* (Sieb. et Zucc.) C. Tanaka が広く見られるが、キケンショウマ *C. acerina* var. *peltata* (Makino) Hara が本州中部の狭い地域に分布している²⁾。中国では、上記サラシナショウマ（単穂升麻）およびオオバショウマ（金竜草）以外に、興安升麻（北升麻）*C. dahurica* (Turcz.) Maximowicz、南川升麻 *C. nanchuanensis* Hsiao、升麻（西升麻）*C. foetida* Linné、大三葉升麻（関升麻）*C. heracleifolia* Komarov、雲南升麻 *C. yunnanensis* Hsiao、短果升麻 *C. brachycarpa* Hsiao などが分布している^{3, 4)}。ヨーロッパおよび北アメリカの東部では、アメリカショウマ *C. racemosa* Nutt. (= *C. serpentaria* = *Actaea racemosa*) が自生し、その根茎はヨーロッパで民間薬として神経痛、リュウマチ、月経異常などに使用されている⁵⁾。

2. 研究の目的

升麻は、「神農本草経」の上品に収載され、消炎・解熱・解毒・止血などの効果を期待して、乙字湯、散腫潰堅湯、紫根牡蛎湯、除湿補気湯、補中治湿湯、升麻葛根湯、補中益気湯、立効散などに配合されている重要な生薬である⁶⁻⁹⁾。升麻およびサラシナショウマ属の数種の植物からは、数多くの成分が報告されているが、それらのう



Fig. 1. Plants and their subterranean parts of *Cimicifuga simplex*.

ち actein, cimigenol, cimicifugoside, cimifugin, visaminol, norvisnagin, visnagin, isoferulic acid などについては、生物活性に関する報告もみられる¹⁰⁻¹³⁾。最近の報告としては、寺澤らがマウス interleukin-8 産生抑制物質として関升麻 (*C. heracleifolia*) の isoferulic acid¹⁴⁾、門田らが骨吸収亢進抑制物質として関升麻および西升麻 (*C. foetida*) のシクロアルテノール系トリテルペノイド類¹⁵⁾、草野らがヌクレオシドの取り込み阻害物質および免疫抑制物質としてサラシナショウマに含まれる cimicifugoside に関するものなどがあげられる¹⁶⁾。しかし、本属にはこれらの活性成分のほかに、扁桃腺炎・口内炎・腸炎などに対する消炎・解熱・止血の効果と関係があると推定されるタンニン活性成分の存在が示唆され、升麻の薬理作用に大きく関与している可能性が未解決のまま残されている。

以上の背景から筆者は、これらの薬理作用に関与する生物活性成分の探索を目的として、サラシナショウマ地下部に含まれる水溶性成分の単離・構造決定を行い、その生物活性評価を試みた。また、サラシナショウマ属植物にはシクロアルテノール系四環性トリテルペノイド類（以下、トリテルペノイドまたはトリテルペン系化合物と略）が多く含まれるが、これらの化合物の抗マラリア原虫作用とヌクレオシド取り込み阻害活性についての検討を行った。

3. 研究の概要

漢方薬としての升麻は、熱水で抽出され、煎剤として利用される。そこで、その薬理活性成分は水に可溶であると考えられる。筆者は、今日までその分離・精製の困難さのために、重要と認識されつつも解明の遅れていたサラシナショウマ地下部の水溶性生物活性成分に着目し、その単離を試みた。まず、サラシナショウマ地下部（滋賀県伊吹山産）のメタノール抽出液を、水-*n*-ブタノール-酢酸エチルにより分配後、水層部をダイアイオン HP-20 カラムクロマトグラフィー（三菱化学、東京）に通導し、吸着部分をメタノールで溶出したところ、多数の水溶性芳香族成分が吸着部分に含まれていることが見いだされた。この吸着成分中に生物活性成分が含まれることを想定

し、各種クロマトグラフィー（以下、クロマトと略）を繰り返すことにより 23 種の目的成分 **1**–**23** を単離・精製することができた (Fig. 2)。

これらの成分は、升麻の抗炎症・抗浮腫作用の本体とされる isoferulic acid (**12**) と ferulic acid (**11**) を中心とする caffeic acid 誘導体¹⁷⁾、桜井らが既に北升麻から見出した fukinolic acid (**4**)¹⁸⁾、そして本研究により見い出された 10 種の新規 fukiic および piscidic acid のエステル誘導体などであった。これらのうち、成分 **4**, 3 種の新規 fukiic acid エステル [cimicifugic acid A–C と命名 (**1**–**3**)] および 3 種の新規 piscidic acid エステル [cimicifugic acid D–F と命名 (**6**–**8**)] がサラシナショウマに高い乾燥重量比（以下、含率と略）で含まれ、升麻を特徴付ける成分と考えられた。さらに、新規 oxopropyl isoferulate [cimiciphenol と命名 (**19**)] を得ると共に、cimifugin¹⁹⁾、2 種のクロモン配糖体 (**20**, **21**) および 2 種のフラボノール配糖体 (**22**, **23**) が *Cimicifuga* 属植物から初めて見い出された。また、HPLC 分析により、eucomic acid (**24**)、hydroxyeucomic acid (**25**)、chlorogenic acid (**26**) などとも含有されることが明らかとなった。また、成分 **24** と **25** がサラシナショウマ中に含有成分として見い出されたことは、shikimic acid が α -keto acid を経て fukiic acid (**5**) および piscidic acid (**9**) となり、これらがさらに caffeic acid 誘導体とエステル結合して cimicifugic acid A–F および cimiciphenol が形成する生合成経路が推定される。

一方、今回サラシナショウマ *C. simplex* から得られた 23 種の芳香族成分 **1**–**23** を用いて、3 種の日本産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica*) および 3 種の中国産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. heracleifolia*, *C. foetida*, *C. dahurica*) の根茎の水–メタノール (1:1) のエキス中に含まれる芳香族成分について、HPLC 分析により比較検討した。その結果、23 種の化合物の大多数が共通成分として含まれており、特に成分 **1**, **2**, **4** および **6**–**8** は含率高く、かつ *Cimicifuga* 属植物の種の違いにより特徴的な成分含量を示すことが見い出された。現在、升麻の市場流通品のほとんどは上記 3 種の中国産升麻であるが、異物同名の生薬が多いとされ、日本産サラシナショウマはほとんど流通していない²⁰⁾。また、升麻の外部形態は類似しており、基原植

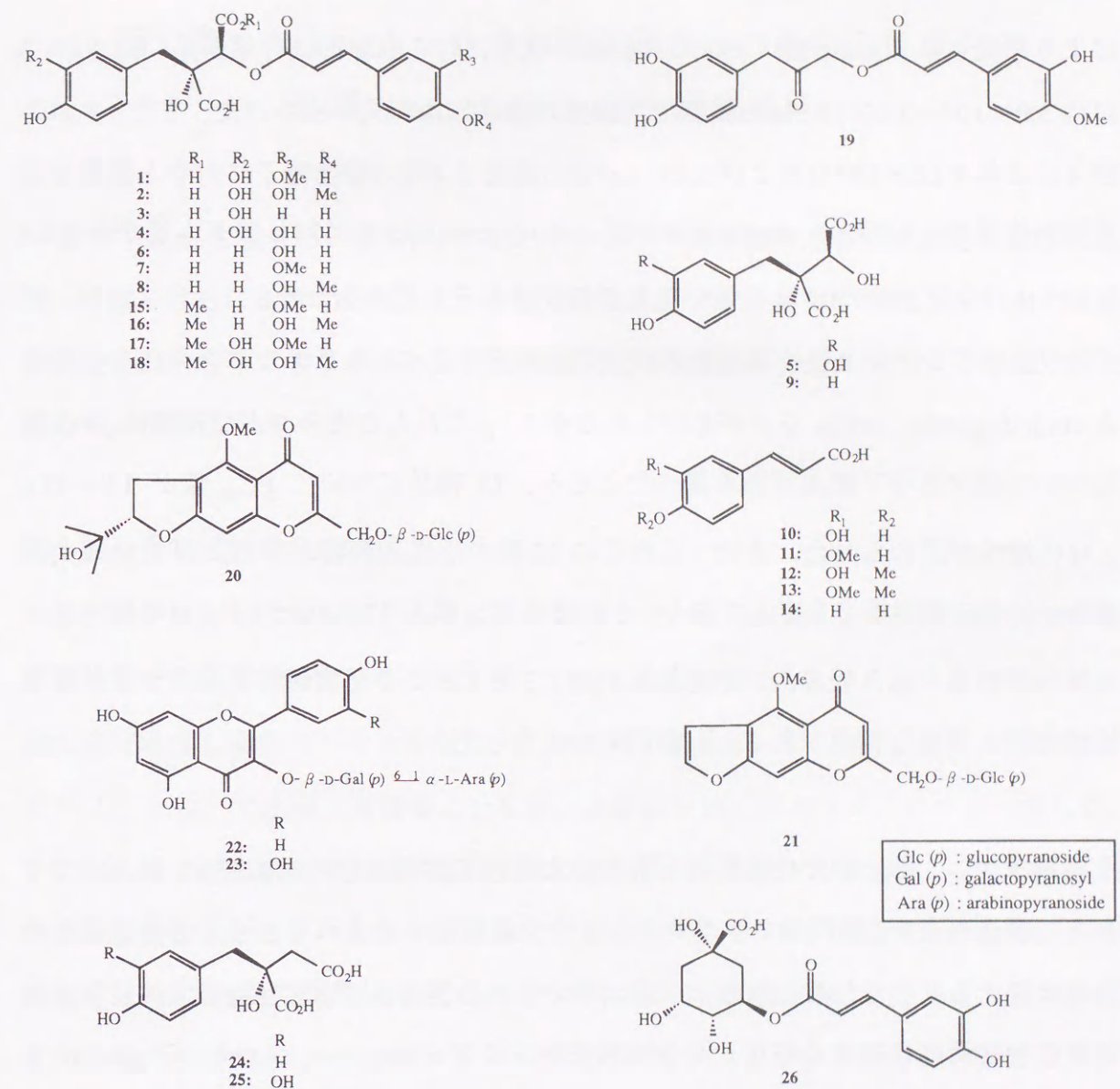


Fig. 2. Structures of compounds **1**–**26**.

物の識別は難しいとされ、局方においても外観による性状以外には確認試験項目がないだけでなく、基原種の鑑別も行っていない¹⁾。今回の研究結果は、升麻の基原植物を識別する手段として有用であると共に、今後の升麻に含まれる芳香族成分研究に大きく寄与するものと考えられる。

今回得られた芳香族成分の中で **1**–**7** について、ラット摘出大動脈血管平滑筋標本に対する作用を検討した結果、**4** および **6** には各々 3.0×10^{-4} M の濃度で norepinephrine

により誘発される tonic 相における大動脈の収縮に対し収縮抑制作用が見い出され, 3 には $1.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ M の濃度で大動脈の収縮作用が見い出された. また, 1 および 4 には各々 1.0×10^{-4} M および 3.0×10^{-4} M の濃度で 4 種の植物種子に対する顕著な発芽抑制作用が, 1 には α -amylase および carboxypeptidase A に対して IC_{50} 値が各々 2.4×10^{-5} M および 2.0×10^{-4} M の強い阻害活性がそれぞれ認められた.

一方, サラシナショウマ属植物の代表的な成分として, トリテルペン系化合物である cimicifugoside, actein などがあげられるが²¹⁾, これらの成分および誘導体 59 検体について抗マラリア原虫活性を調べたところ, 25 検体について EC_{50} 値が $1.0 - 13.0 \mu$ M の活性が認められた. また, これらの 25 種の活性化合物のうち, 19 検体は共通の hemiacetal 側鎖構造を有しており, 9 検体に IC_{50} 値が 17.8 nM $- 1.7 \mu$ M の強いヌクレオシドの取り込み阻害活性が認められた. さらに, この阻害活性と抗マラリア原虫活性の間に密接な相関があることが明らかとなった.

本論文では, 第二章で生物活性を有する水溶性芳香族成分の単離法を, 第三章でそれらの構造研究を, 第四章でサラシナショウマ属植物に含まれる水溶性芳香族成分の分布に関する研究を, 第五章および第六章でこれら芳香族成分の生物活性 (ラット大動脈血管平滑筋に対する作用, 発芽抑制作用および α -amylase と carboxypeptidase A に対する阻害活性) を, 第七章でサラシナショウマ属植物から得られるトリテルペノイドの抗マラリア原虫活性とヌクレオシドの取り込み阻害との関係についてそれぞれ詳述する.

第二章 サラシナショウマ地下部からの生物活性成分の単離 (cimicifugic acid 類の発見)

前章で述べた理由から筆者は, サラシナショウマ地下部の水溶性生物活性成分の単離・精製を目的に本研究を行った. 本章では主にサラシナショウマ地下部の水に可溶性画分に高い含率で含まれる水溶性芳香族成分 (塩化第二鉄陽性成分) の単離・精製法について論述する.

第一節 生物活性成分の単離

滋賀県伊吹山地区に自生するサラシナショウマ (*C. simplex*) を, 大阪薬科大学薬用植物園で数年間栽培し, その地下部 1.1 Kg (乾燥重量) を, メタノールで抽出後, 抽出液を濃縮し褐色のエキスを得た. これを水で懸濁し, 水-*n*-ブタノール-酢酸エチル (2:1:1) で水層と有機層に分配後, 水層部を HP-20 カラムクロマトに付した. この HP-20 カラムクロマトの吸着部を水で洗浄後, メタノールで溶出し, さらに溶出部を減圧濃縮しメタノールエキスを得た. このエキスを TLC で調べたところ, 芳香族成分以外に有機溶媒類に可溶なトリテルペン系の化合物²¹⁾ は含まれておらず, 両者の分離は良好であった. このメタノールエキスをオクタデシルシリカゲルカラムクロマトグラフィー (以下, ODS カラムクロマトと略) に付し, 芳香族成分である塩化第二鉄陽性成分を含むメタノール-水 (2:1) 溶出画分を得た. この溶出画分を減圧濃縮し, 褐色ジャム状物質 (13.5 g) を得た. この濃縮物の一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (以下, SiO_2 カラムクロマトと略) に付し, まずクロロホルム-メタノール (2:1) 溶出画分より, cimifugin および成分 20 を得た. さらに, 芳香族成分の多くがクロロホルム-メタノール (1:2) 溶出画分に arginine や histidine の塩として含まれていることが NMR スペクトルおよびアミノ酸分析により明らかとなったため, 1N 塩酸処理後, 再度 HP-20 カラムクロマトに付し, メタノール-水 (5:1-1:0) 溶出画分を得た. この溶出画分は目的成分を含む粗精物であったので, 第

二節で述べる分取用 HPLC により単離・精製し、水溶性芳香族成分として **1-20** を得た。さらに、前述した ODS カラムクロマトより得た画分の一部を 1N 塩酸酸性下、酢酸エチルで抽出すると、芳香族成分の多くは有機層部へ移行したが、一部の芳香族成分が水層部に残った。この水層を HP-20 カラムクロマトに付し、メタノール-水 (5:1-1:0) 溶出画分を、第二節で述べる分取用 HPLC に付し、芳香族成分 **20-23** を得た。また、同メタノール-水 (1:4) 溶出画分の HPLC 分析を行った結果、eucomic acid (**24**)、hydroxyeucomic acid (**25**) および chlorogenic acid (**26**) の存在が明らかとなった (Fig. 3)。

一方、cimicifugoside (**27**) を中心とする有機溶媒に可溶なトリテルペン系の化合物類²¹⁾ (第七章) は、サラシナショウマ地下部のメタノール抽出液を、水-*n*-ブタノール-酢酸エチル (2:1:1) で水層と有機層に分配後、有機層部を ODS カラムクロマトを中心とした各種クロマトを繰り返すことにより得られた (Fig. 3)。

第二節 水溶性芳香族成分の HPLC による精製法

水溶性芳香族成分は水およびメタノールには溶解し易いが、有機溶媒に難溶であり、混合物として得られたので、これらの精製法を種々検討した。その結果、HPLC のカラムとして芳香族化合物に対して保持力の高いシリカゲル表面にフェニル基またはフェニルエチル基の結合した充填剤を有するコスモシル 10Ph および 5PE カラム (ナカライテスク、京都) を用い、新たなグラジエントの HPLC 分取条件により目的物をそれぞれの単一物として単離・精製することができた。この分取条件を用いて、第一節で述べた ODS カラムクロマトで、メタノール-水 (2:1) の溶出画分から得られた粗精物から、新規 cimifugic acid A-F を中心とする成分 **1-20** を得ることができた。また、成分 **21-23** については、この条件でも明確な分離ができなかったので、1N 塩酸処理し、酢酸エチルで抽出後、水層を HP-20 カラムクロマトに付し、吸着部をメタノールで溶出後、溶出液を HPLC 分取することで単離・精製することができた (Figs. 3 および 4: HPLC profile A)。

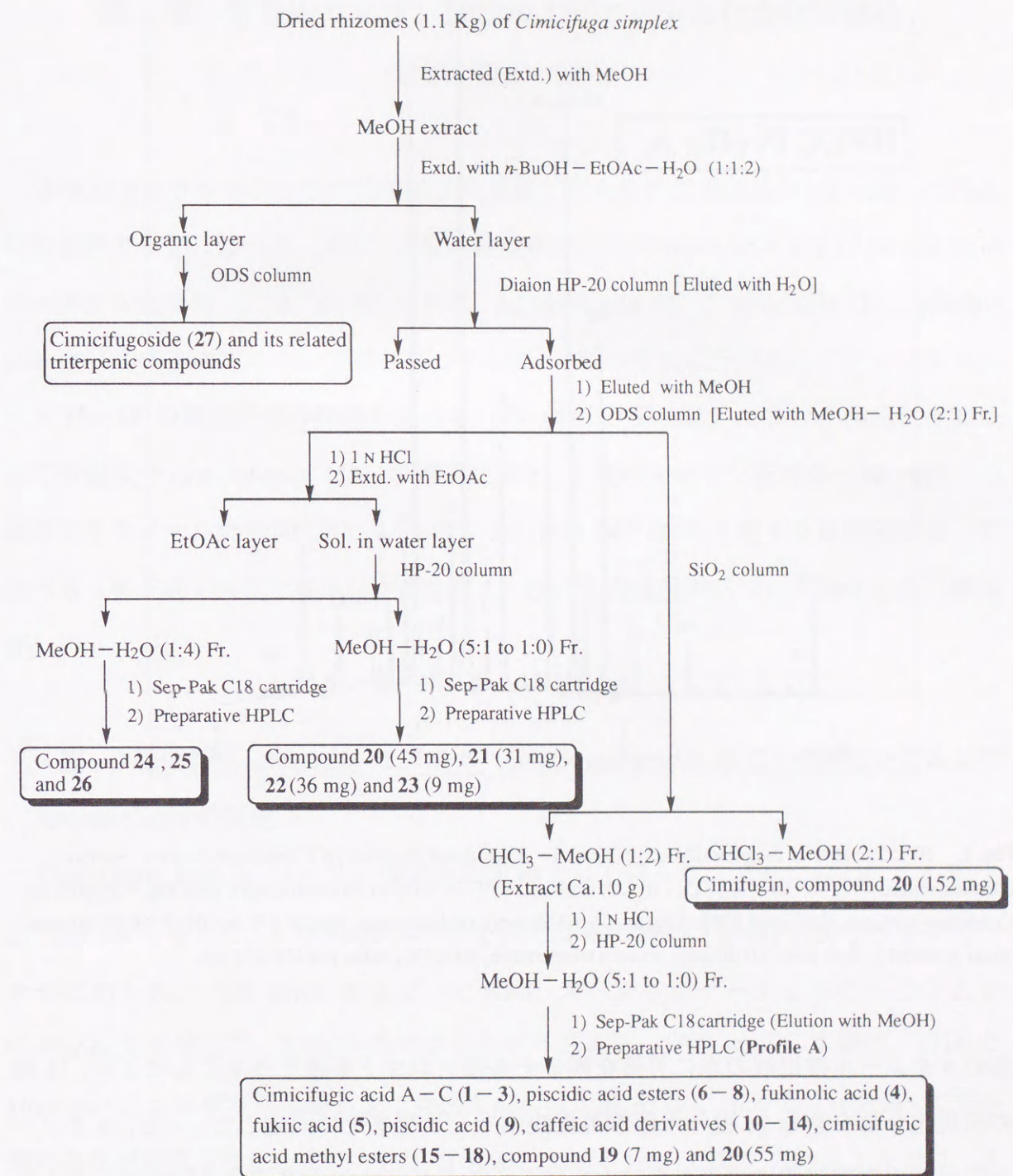


Fig. 3. Isolation and purification of phenolic compounds **1-26** () and triterpenic compounds () from *Cimicifuga simplex*.

第三節 小結

サラシナショウマ地下部に含まれ生物活性物質の単離・精製を目的に、その地下

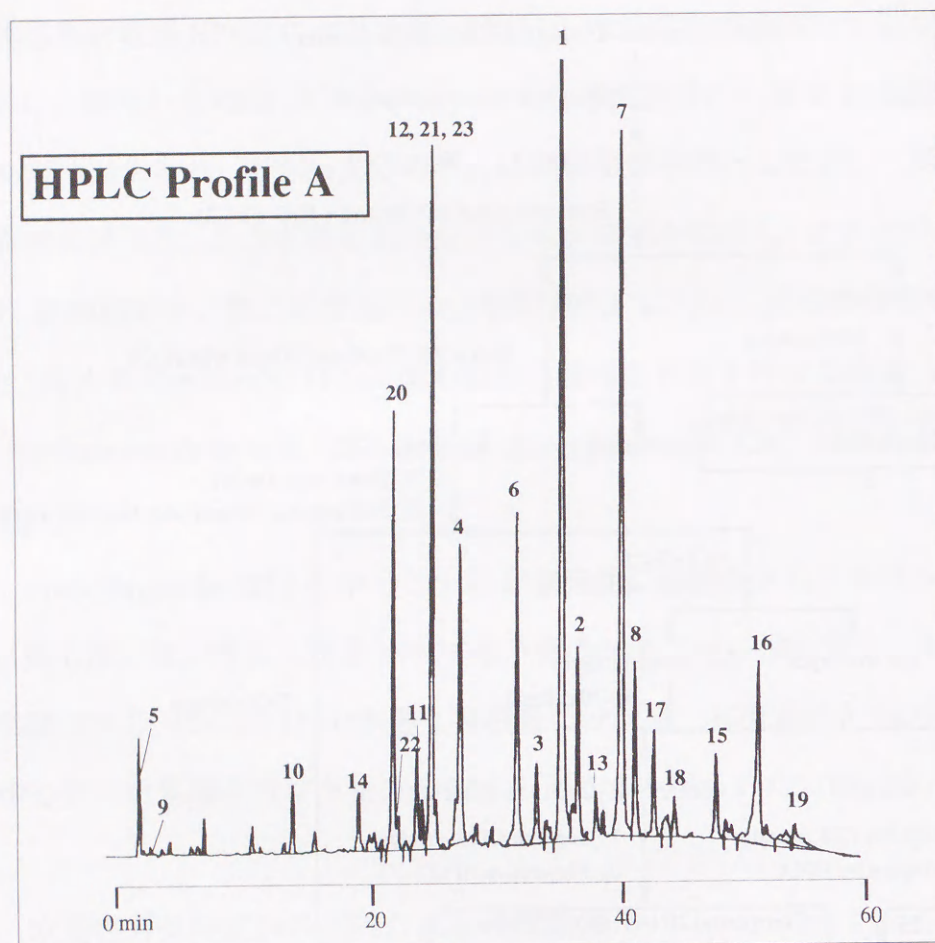


Fig. 4. HPLC profile of the phenolic compounds **1–23** of dried rhizomes of *Cimicifuga simplex*. Sample : fractions eluted with MeOH–H₂O (5:1 to 1:0) on Diaion HP-20 column chromatography (See **Fig. 3, Profile A**). Condition : column, Cosmosil 10Ph (10 μ m, 4.6 \times 150 mm); mobile phase, MeCN-1% AcOH (5–45% 50 min, linear gradient); flow rate, 2.0 ml/min; column temperature, 40 \pm 1 $^{\circ}$ C; detection UV 254 nm.

部のメタノール抽出液の水に可溶な画分を各種クロマトを繰り返すことにより、11 種の新規化合物を含む 26 種の水溶性芳香族成分を単離または同定した。一方、メタノール抽出液の有機溶媒に可溶な画分からは多くのトリテルペン系の化合物が得られた (第七章)。

第三章 芳香族カルボン酸類およびエステル化合物の構造 (化合物 **1–26**)

本章ではサラシナショウマ地下部より単離した水溶性芳香族成分 (**1–26**) の構造研究過程を中心に述べる。まず、6 種の新規成分として fukiic acid および piscidic acid のエステル化合物 (**1–3**, **6–8**) と共に、fukinolic acid (**4**) , fukiic acid (**5**) , piscidic acid (**9**) の構造決定について述べる。さらに、4 種の新規成分であるモノメチルエステル **15–18** の構造決定の経過を述べる (第一および第二節)。また、関連化合物として新規成分 cimicifhenol (**19**) の構造決定と、2 種のクロモン配糖体 (**20**, **21**) , 2 種のフラボノール配糖体 (**22**, **23**) および化合物 **24–26** の単離または同定について述べる (第三節)。また章末に、化合物 **1–19** の生合成経路について論述した (第四節)。

第一節 3 種の新規 fukiic acid エステル (cimicifugic acid A, B, C) の構造決定および fukinolic acid の同定

Cimicifugic acid A (**1**) は、微黄色粉末物として得られ、 $[\alpha]_D^{+47.8^{\circ}}$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 328 nm を有した。**1** の SIMS スペクトルでは m/z 449 に (M+H)⁺ の分子イオンピークが認められ、HR-SIMS および ¹³C-NMR スペクトルデータよりその分子式を C₂₁H₂₀O₁₁ と決定した。**1** の IR スペクトルデータより、3400 cm⁻¹ に水酸基、1714 と 1629 cm⁻¹ にカルボキシル基および共役カルボニル基、そして 1600 と 1516 cm⁻¹ に芳香環の存在が示唆された。また、**1** の ¹H-NMR および ¹H-¹H COSY スペクトルでは、 δ 2.93 と 3.06 に AB type の孤立した一対の二重線 (d, J = 13.6 Hz, 2H) が認められ、芳香環に隣接するメチレンプロトンに帰属された (部分構造 A)。また、 δ 5.67 の ¹H 相当の一重線はエステルのカルボキシル酸素についたメチンプロトン (–COO–CH–) に帰属された (部分構造 B)。また、 δ 6.51 と 7.79 にそれぞれ ¹H 相当の二重線 (J = 16.0 Hz) が認められ、共役カルボニル基のトランス二重結合上のオレフィンプロ

ロトンに帰属された。また、 δ 7.24 に 1H 相当の二重線 ($J=2.4$ Hz) , δ 7.13 に 1H 相当の四重線 ($J=8.5, 2.4$ Hz) , δ 6.84 に 1H 相当の二重線が認められ, δ 3.91 に 3H 相当のベンゼン環上のメトキシ基に帰属されるピークが認められることより, フェルロイル基の存在が示唆された (部分構造 C) 。さらに, δ 6.76 に 1H 相当の二重線 ($J=2.2$ Hz) , δ 6.61 に 1H 相当の四重線 ($J=8.0, 2.2$ Hz) , δ 6.66 に 1H 相当の二重線 ($J=8.0$ Hz) が認められ, 1,3,4-三置換ベンゼン環の存在が示唆された (部分構造 D) (Fig. 5) 。

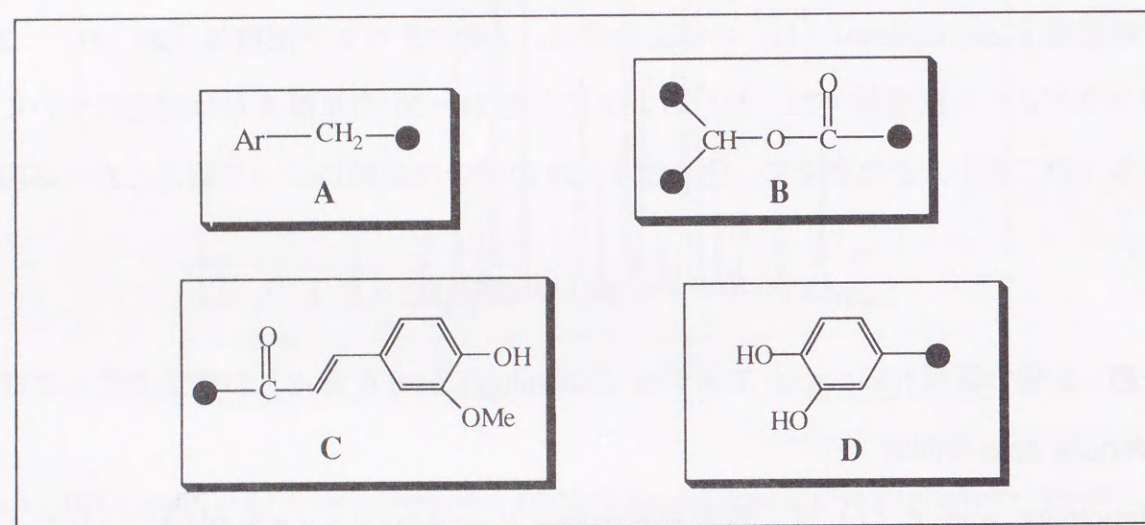


Fig. 5. Partial structures of cimicifugic acid A (1).

フェルロイル基の存在は, ROESY スペクトルにより, ベンゼン環上のメトキシ基と同一ベンゼン環上の H-2''' とに ROE が観察されることから確認された。以上のスペクトルデータより, **1** は fukiic acid (**5**) と ferulic acid (**11**) のエステルであると考えられ²²⁾, SIMS スペクトルにおいて m/z 177 (フェルロイル基) と, m/z 123 (3,4-ジヒドロキシベンジル基) にフラグメントイオンピークが認められることから支持された。エステル結合の位置は, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで H-2 に帰属される δ 5.67 のピークが, **5** の H-2 (δ 4.50) に比べて 1.17 ppm 低磁場シフトしていること, また

HMBC スペクトルにおいて, H-2 と C-4, C-3, C-1'' および C-1 の間にクロスピークが存在することにより, フェルロイル基が **5** の C-2-O に結合していることが明らかとなった (Fig. 6) 。

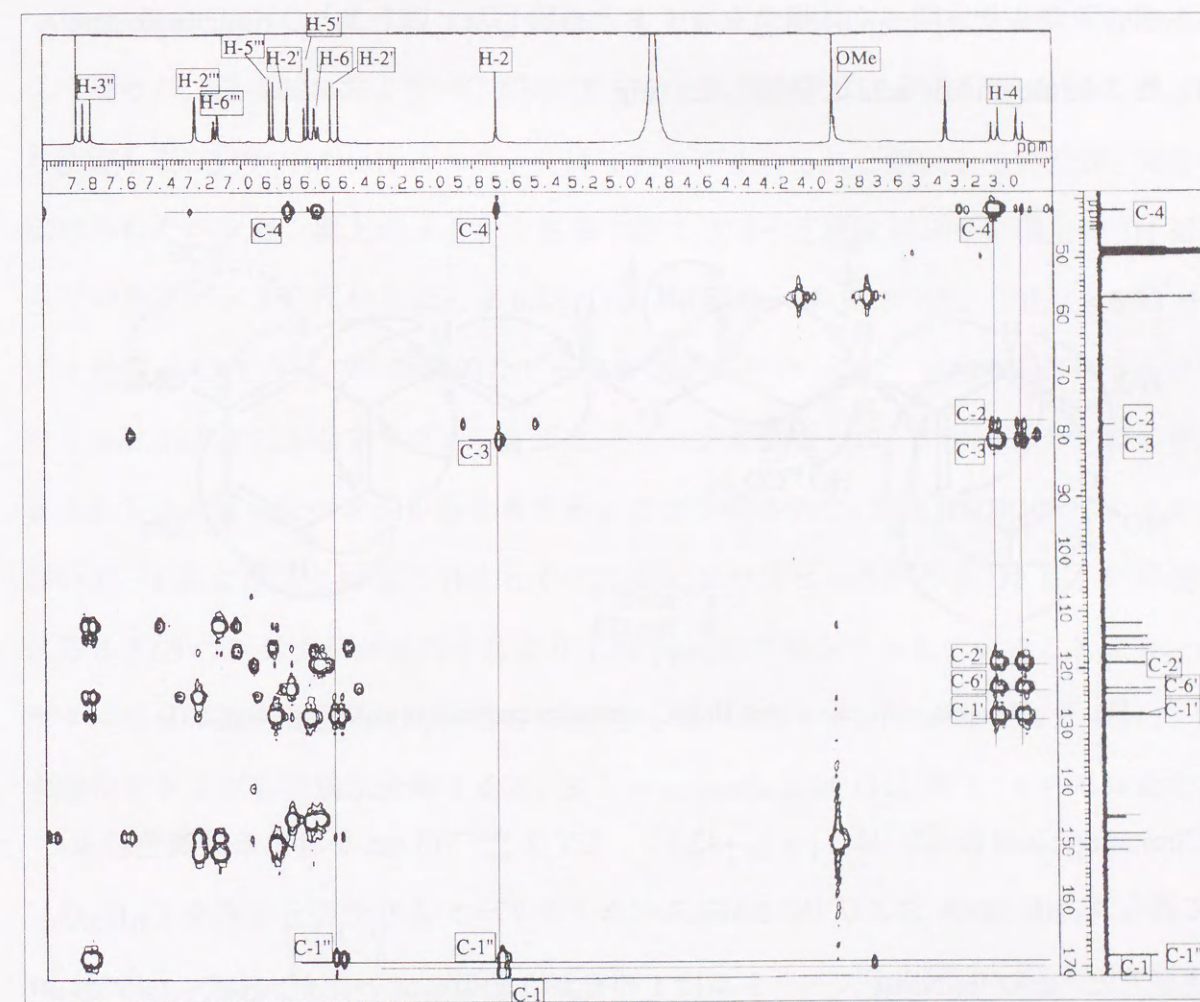


Fig. 6. HMBC spectrum of cimicifugic acid A (1) in CD_3OD .

1 は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **5** と **11** を 1:1 のモル比で与えた。加水分解物 **5** は, $[\alpha]_D +29.9^\circ$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 248 nm を有するオイル状物として得られ, HR-SIMS スペクトルによりその分子式を $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_8$ と決定した。本品の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ および IR スペクトルデータは, fukinolic acid (**4**) の加水分解により得られ

た fukiic acid に完全に一致したので、**5** を fukiic acid と同定した。Fukiic acid は、*Petasites japonicus* (フキ：キク科 Compositae)^{22,23)} および *Piscidia erythrina* (マメ科 Leguminosae) から 1-モノメチルエステル体として単離されており²⁴⁾、その C-2 および C-3 の絶対配位は 2*S* および 3*R* である²⁵⁾。その $[\alpha]_D$ 値が $+40.5^\circ$ に対し、**5** のそれは $+29.9^\circ$ であり、同一立体構造を有すると結論した。以上より、cimicifugic acid A (**1**) を 2-feruloylfukiic acid と結論した (Fig. 7)。

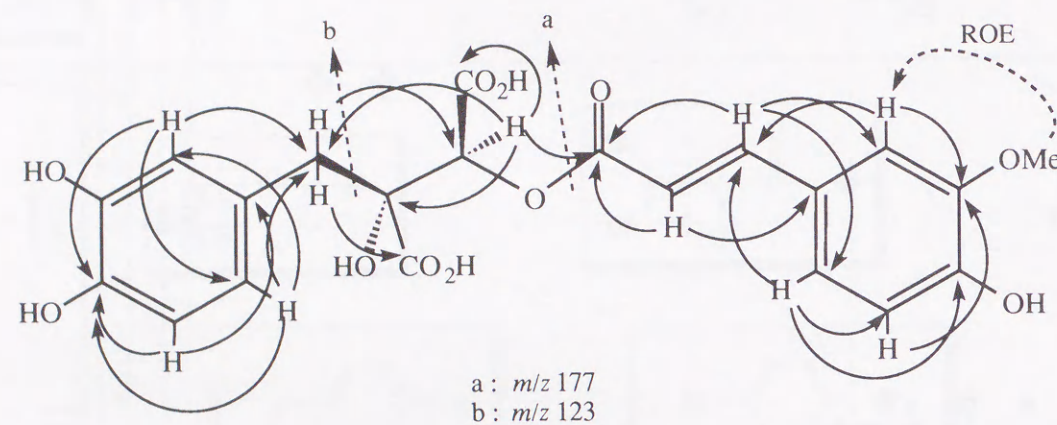


Fig. 7. MS spectral fragment ions, HMBC correlation and ROE of cimicifugic acid A (**1**).

Cimicifugic acid B (**2**) は、 $[\alpha]_D +42.5^\circ$ 、UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 313 nm を有する微黄色粉末として得られ、HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ と決定した。**2** の ^1H -NMR スペクトルは **1** のそれと類似していたが、H-2''', H-5''' および H-6''' に帰属されるシグナルパターンが **1** のそれと異なっていた (Table 1)。これらのデータは、**2** が **1** のフェルロイル基の代わりに、イソフェルロイル基を有することを示しており、このことは δ 3.90 のメトキシ基と H-5''' (δ 6.97) の間に ROE が観察されることから支持された。また **2** は、SIMS スペクトルにおいて **1** と同様に m/z 177 と 123 にフラグメントイオンピークが認められることより、イソフェルロイル基と 3,4-ジヒドロキシベンジル基を有することが示唆された。**2** の HMBC スペクトルにおいて、H-2 と C-1'' の間にクロスピークが認められ、H-2 に帰属される δ 5.66 のシグ

ナルが **5** のそれより 1.16 ppm 低磁場シフトしていることより、イソフェルロイル基が **5** の C-2-O に結合していることが明らかとなった。**2** は、2*N* 水酸化ナトリウムで加水分解すると、**5** と isoferulic acid (**12**) を 1:1 のモル比で与えた。以上より、**2** を 2-isoferuloylfukiic acid と結論した (Fig. 8)。

Cimicifugic acid C (**3**) は、 $[\alpha]_D +38.7^\circ$ 、UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 313 nm を有する微黄色粉末として得られ、HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ と決定した。**3** の ^1H -NMR スペクトルは **1** および **2** のそれと類似していたが、両者で認められたベンゼン環上のメトキシ基および 1,3,4-三置換ベンゼン環上の 3H 相当のプロトンピークの代わりに、 δ 6.83 (2H, $J = 6.83$ Hz) と δ 7.52 (2H, $J = 6.83$ Hz) に 1 対の AA'XX' タイプの特徴的なピークが認められた。また、SIMS スペクトルにおいて m/z 147 と 123 のフラグメントイオンピークが認められ、**3** がパラクマロイル基と 3,4-ジヒドロキシベンジル基を有することが示唆された。**3** の HMBC スペクトルにおいて、**1** および **2** と同様に H-2 と C-1'' の間にクロスピークが存在し、H-2 に帰属される δ 5.65 のシグナルが **5** のそれより 1.15 ppm 低磁場シフトしていることより、パラクマロイル基が化合物 **5** の C-2-O に結合していることが明らかとなった。**3** は、2*N* 水酸化ナトリウムで加水分解すると、**5** と *p*-coumaric acid (**14**) を 1:1 のモル比で与

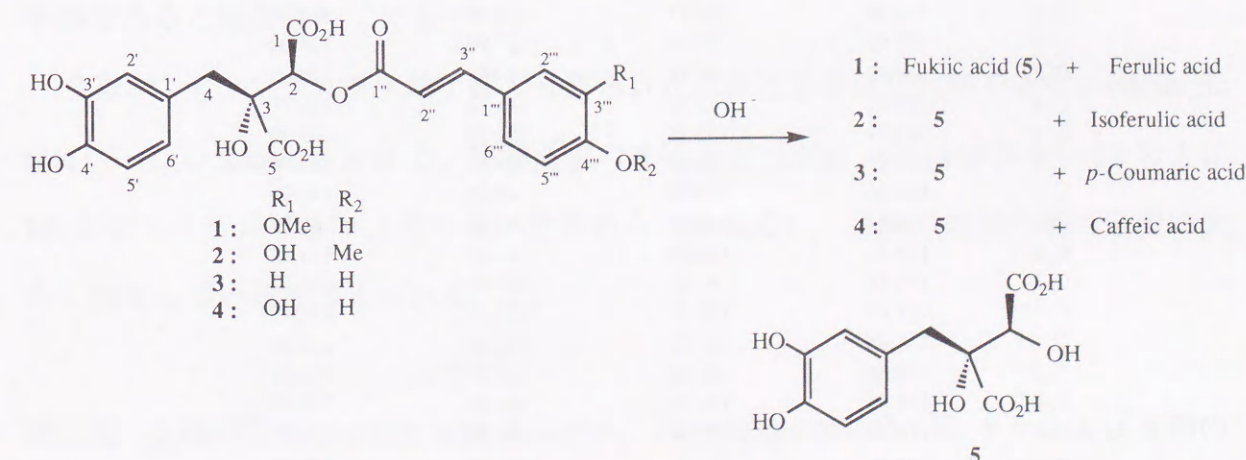


Fig. 8. Structures of cimicifugic acid A (**1**), B (**2**), C (**3**) and fukiic acid (**5**).

Table 1. ¹H - NMR Spectral Data for 1-4

Proton No.	1	2	3	4
H-1	—	—	—	—
H-2	5.67 br s	5.66 br s	5.65 br s	5.65 br s
H-3	—	—	—	—
H-4	2.93 d (13.6) 3.06 d (13.6)	2.92 d (13.7) 3.04 d (13.7)	2.92 d (13.8) 3.04 d (13.8)	2.92 d (13.5) 3.03 d (13.5)
H-5	—	—	—	—
H-1'	—	—	—	—
H-2'	6.76 d (2.2)	6.75 d (2.3)	6.75 d (2.3)	6.74 d (2.2)
H-3'	—	—	—	—
H-4'	—	—	—	—
H-5'	6.66 d (8.0)	6.64 d (7.9)	6.65 d (8.2)	6.64 d (8.2)
H-6'	6.61 dd (8.0, 2.2)	6.60 dd (7.9, 2.3)	6.60 dd (8.2, 2.3)	6.59 dd (8.2, 2.2)
H-1''	—	—	—	—
H-2''	6.51 d (16.0)	6.47 d (15.9)	6.48 d (16.0)	6.42 d (16.0)
H-3''	7.79 d (16.0)	7.75 d (15.9)	7.79 d (16.0)	7.72 d (16.0)
H-1'''	—	—	—	—
H-2'''	7.24 d (2.4)	7.14 d (2.5)	7.52 d (8.4)	7.10 d (2.3)
H-3'''	—	—	6.83 d (8.4)	—
H-4'''	—	—	—	—
H-5'''	6.84 d (8.5)	6.97 d (8.2)	6.83 d (8.4)	6.80 d (8.3)
H-6'''	7.13 dd (8.5, 2.4)	7.11 dd (8.2, 2.5)	7.52 d (8.4)	7.01 dd (8.3, 2.3)
OC ₂ H ₅	3.91 s	3.90 s	—	—

Chemical shifts are in δ values and are followed by multiplicities and J values (in Hz).

Table 2. ¹³C - NMR Spectral Data for 1-4

Carbon No.	1	2	3	4
C-1	170.65	170.09	170.54	170.90
C-2	77.52	77.75	77.60	78.28
C-3	80.10	79.43	80.13	80.15
C-4	42.20	42.21	42.22	42.22
C-5	174.99	175.21	174.98	174.78
C-1'	127.95	128.04	127.99	128.04
C-2'	118.82	118.85	118.85	118.83
C-3'	145.67	145.72	145.72	145.71
C-4'	145.27	145.30	145.30	145.30
C-5'	115.96	115.94	115.96	115.94
C-6'	123.06	123.02	123.06	123.05
C-1''	168.21	168.07	168.26	168.29
C-2''	114.53	114.96	114.27	114.26
C-3''	148.16	147.82	147.90	148.22
C-1'''	127.69	128.91	127.19	127.79
C-2'''	111.94	115.32	131.38	115.32
C-3'''	149.38	148.08	116.90	146.85
C-4'''	150.81	151.74	161.46	149.83
C-5'''	116.53	112.64	116.90	116.55
C-6'''	124.36	123.06	131.38	123.25
OC ₂ H ₅	56.52	56.43	—	—

えた。以上より, 3 を 2-*p*-coumaroylfukiic acid と結論した (Fig. 8)。

Fukinolic acid (4) は, $[\alpha]_D +51.2^\circ$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 332 nm を有する微黄色粉末として得られ, HR-SIMS および ¹³C-NMR スペクトルデータよりその分子式を C₂₀H₁₈O₁₁ と決定した。4 の SIMS スペクトルにおいて, カフェオイル基と 3,4-ジヒドロキシベンジル基の存在を示唆する m/z 163 と 123 のフラグメントイオンピークが認められた。4 は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, 5 と caffeic acid (10) を 1:1 のモル比で与えた。4 は, *Petasites japonica* から得られた fukinolic acid の標品と, その ¹H-NMR, ¹³C-NMR スペクトルデータおよび HPLC の保持時間 (t_R) を直接比較し一致することにより fukinolic acid と同定した (Fig. 8)。一方, 1-4 とは別に fukiic acid (5), ferulic acid (11), isoferulic acid (12), *p*-coumaric acid (14) および caffeic acid (10) をサラシナショウマ地下部から各々独立に単離し, 標品のスペクトルデータと直接比較することにより同定した。5 は, *Cajanus cajan* L. (pigeonpea: マメ科 Leguminosae) の根から分泌され, 低リン (P) 酸土壌からリン酸とキレートを作り, リン酸を効率よくかつ強力に植物体内に取り込ませる成分として知られている²⁶⁾。また, 5 は *Cimicifuga* 属植物 (キンポウゲ科 Ranunculaceae) からだけでなく, pigeonpea 以外の植物から単離された例は今回が初めてであるが, 植物生理学上重要な役割をはたしている可能性が考えられる。一方, 11 および 12 は, 升麻の薬理作用である抗炎症作用の本体であると報告されている¹⁷⁾。

今回, サラシナショウマ地下部より得られた水溶性芳香族化合物である cimicifugic acid A-C と fukinolic acid は, 生物活性のある 5 と caffeic acid 誘導体 10-12 および 14 とのエステルであり, その高い含率から (第四章), 升麻の薬理作用の発現に大きく関与していると考えられる。

第二節 3 種の新規 piscidic acid エステル (cimicifugic acid D, E, F) および 4 種の新規 モノメチルエステルの構造

サラシナショウマ地下部の水溶性成分として, 前節で述べた cimicifugic acid A-C

および fukinolic acid と共に、3 種の新規 piscidic acid エステル **6**–**8**, piscidic acid (**9**) および 4 種の新規メチルエステル **15**–**18** を各々単離した。本節では、これらの構造決定について述べる。

Cimicifugic acid D (**6**) は、微黄色粉末物として得られ、 $[\alpha]_D +67.3^\circ$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 332 nm を有し、SIMS スペクトルにおいて m/z 419 に $(M+H)^+$ のイオンピークが認められ、HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータより分子式を $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ と決定した。その ^1H -NMR および ^1H - ^1H COSY スペクトルにより、**6** は piscidic acid (**9**)²⁷⁾ と caffeic acid (**10**) とのエステルと推定された。また、その SIMS スペクトルにおいて m/z 163 と 107 のフラグメントイオンピークが認められ、各々カフェオイル基とパラヒドロキシベンジル基の存在が示唆された。また、HMBC スペクトルにおいて H-2 と C-1' (δ 168.31) および H-2 と C-3 (δ 79.90) の間にクロスピークが存在することにより、カフェオイル基が **9** の C-2-O と結合していることを示しており、このことは **6** の H-2 (δ 5.62) が、**9** のそれより 1.07 ppm 低磁場シフトしていることから支持された。**6** は、2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると、**9** と **10** を 1:1 のモル比で与えた。

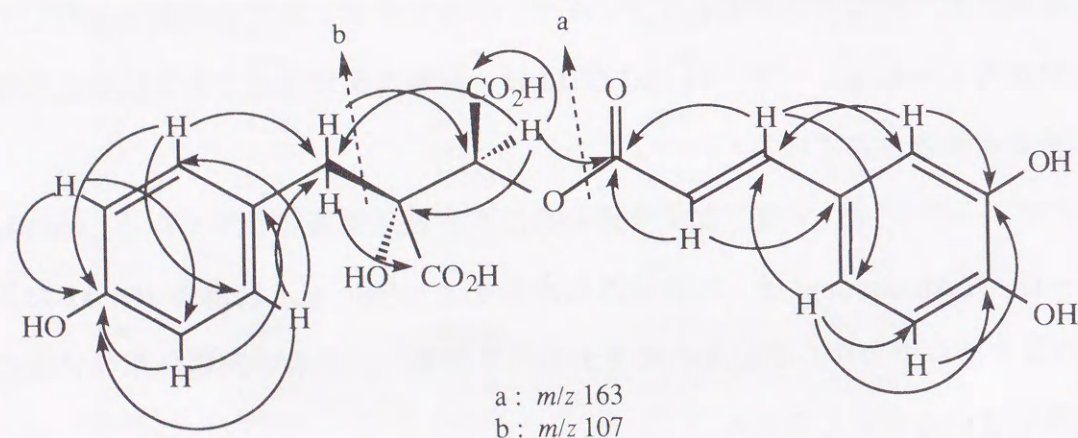


Fig. 9. MS spectral fragment ions, HMBC correlation of cimicifugic acid D (**6**).

9 は、 $[\alpha]_D +42.8^\circ$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 277.5 nm を有する褐色粉末物として得られ、HR-SIMS スペクトルによりその分子式を $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_7$ と決定した。その $[\alpha]_D$ 値、 ^1H -NMR, ^{13}C -

NMR および IR スペクトルデータが、文献記載の piscidic acid のそれらと一致した²⁷⁾。なお、piscidic acid の絶対構造は、(2*S*,3*R*)-2,3-dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-3-carboxybutyric acid と決定されている。以上より、**6** を 2-caffeoylpiscidic acid と結論した (Fig. 9)。

Cimicifugic acid E (**7**) は、微黄色粉末物として得られ、 $[\alpha]_D +50.3^\circ$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 325 nm を有し、SIMS スペクトルにおいて m/z 433 に $(M+H)^+$ イオンピークが認められ、**7** の HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ と決定した。 ^1H -NMR スペクトルは、**6** と近似していたが、3H 相当のメトキシ基が存在し、H-2'', H-5'' および H-6'' のシグナルパターンに違いが認められ、**7** が **6** のカフェオイル基の代わりにフェルロイル基を有することが示唆された。このことは ROE がメトキシ基 (δ 3.90) と H-2'' (δ 7.23) の間に観察されたことから支持された。また、SIMS スペクトルにおける m/z 177 と 107 のフラグメントイオンピークから、各々フェルロイル基とパラヒドロキシベンジル基の存在が示唆された。また、HMBC スペクトルにおいて、H-2 と C-1' の間にクロスピークが存在すること、**7** の H-2 (δ 5.63) が piscidic acid (**9**) のそれより 1.08 ppm 低磁場シフトしているにより、フェルロイル基が **9** の C-2-O と結合していることを示唆していた。**7** は、2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると、**9** と **11** を 1:1 のモル比で与えた。以上より、**7** を 2-feruloylpiscidic acid と結論した (Fig. 10)。

Cimicifugic acid D (**8**) は、微黄色粉末物として得られ、 $[\alpha]_D +37.6^\circ$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 326 nm を有し、SIMS スペクトルにおいて m/z 433 に $(M+H)^+$ イオンピークが認められ、HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ と決定した。**8** の ^1H -NMR スペクトルは、**7** ときわめて近似していたが、H-2'', H-5'' および H-6'' のシグナルパターンに違いが認められ、**8** は **7** のフェルロイル基の代わりにイソフェルロイル基を有することが示唆された。このことは ROE がメトキシ基 (δ 3.89) と H-5'' (δ 6.96) の間で観察されたこと、また SIMS スペクトルにおける m/z 177 と 107 のフラグメントイオンピークの存在からも支持された。HMBC スペクトルにおいて、

H-2 と C-1'' の間にクロスピークが存在すること, **8** の H-2 (δ 5.63) が **9** のそれより 1.08 ppm 低磁場シフトしているによりイソフェルロイル基が **9** の C-2-O に結合していることを示していた. **8** は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **9** と **12** を 1:1 のモル比で与えた. 以上より, **8** を 2-isoferuloylpiscidic acid と結論した (Fig. 10). なお, piscidic acid (**9**) はエステル **6-8** の加水分解物として得られると共に, サラシナショウマ地下部の成分として, 独立して単離・同定された.

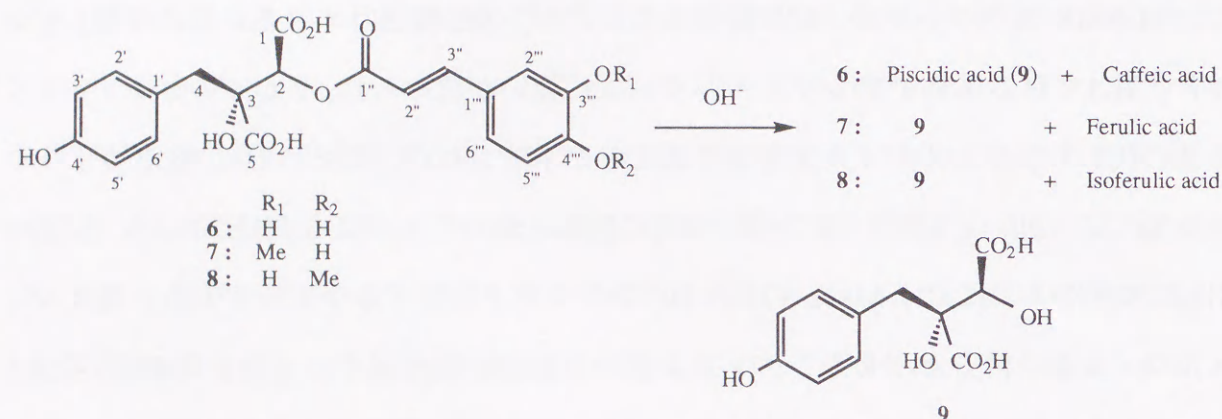


Fig. 10. Structures of cimicifugic acid D (**6**), E (**7**), F (**8**) and piscidic acid (**9**).

成分 **15** は, 微黄色粉末物として得られ, $[\alpha]_D +32.8^\circ$ を有する. その SIMS スペクトルにおいて m/z 447 に (M+H)⁺ イオンピークが認められ, HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ と決定した. **15** の ^1H -NMR スペクトルは, cimicifugic acid E (**7**) と近似していたが, メトキシカルボニル基に由来する 3H 相当の一重線が δ 3.70 に認められた. HMBC スペクトルにおいて, このピークには C-1 (δ 169.16) との間のクロスピークが存在し, C-5 (δ 174.23) とはクロスピークを持たないことより, C-1 のカルボキシル基がメチルエステル化されていることを示していた. **15** は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **9** と **11** を 1:1 のモル比で与えた. 以上より, **15** を 2-feruloylpiscidic acid 1-methyl ester と結論した (Fig. 11).

成分 **16** は, 微黄色粉末物として得られ, $[\alpha]_D +33.6^\circ$ を有する. その SIMS スペ

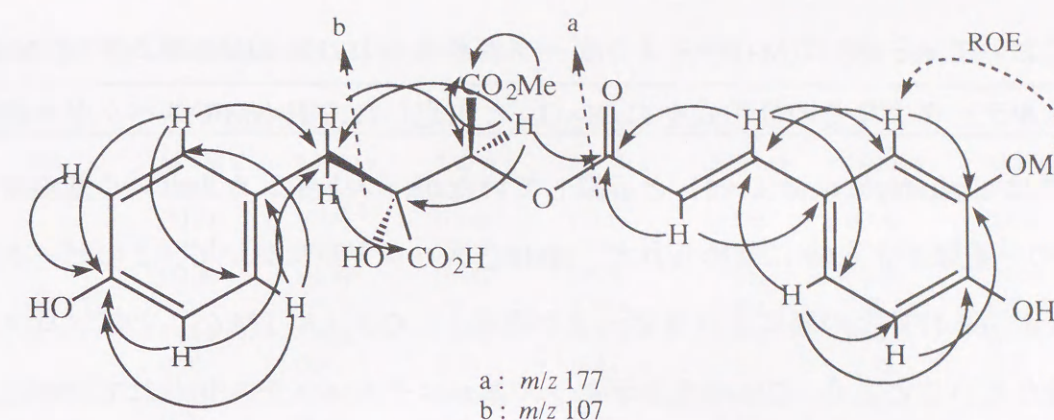


Fig. 11. MS spectral fragment ions, HMBC correlation of compound **15**.

クトルにおいて m/z 447 に (M+H)⁺ イオンピークが認められ, HR-SIMS および ^{13}C -NMR スペクトルデータよりその分子式を $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ と決定した. ^1H -NMR スペクトルにおいて, **16** は cimicifugic acid F (**8**) と近似していたが, メトキシカルボニル基由来の 3H 相当の一重線が δ 3.70 に認められた. HMBC スペクトルにおいて, このピークには C-1 (δ 169.02) との間にクロスピークが存在し, C-5 (δ 174.40) とはクロスピークを持たないことより, C-1 のカルボキシル基がメチルエステル化されていることを示していた. **16** は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **9** と **12** を 1:1 のモル比で与えた. 以上より, **16** を 2-isoferuloylpiscidic acid 1-methyl ester と結論した (Fig. 12).

成分 **17** は, 微黄色粉末物として得られ, $[\alpha]_D +41.3^\circ$ を有する. その SIMS スペ

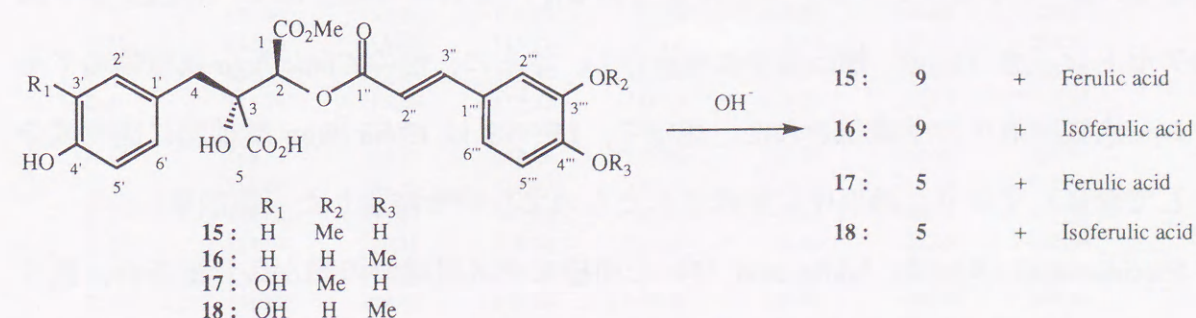


Fig. 12. Structures of compounds **15-18**.

クトルにおいて m/z 463 に (M+H)⁺ イオンピークが認められ, HR-SIMS および ¹³C-NMR スペクトルデータよりその分子式を C₂₂H₂₂O₁₁ と決定した. ¹H-NMR スペクトルにおいて, **17** は cimicifugic acid A (**1**) と近似していたが, メトキシカルボニル基由来の 3H 相当の一重線が δ 3.69 に認められた. HMBC スペクトルにおいて, このピークには C-1 (δ 169.17) との間にクロスピークが存在し, C-5 (δ 174.65) とはクロスピークを持たないことより, C-1 のカルボキシル基がメチルエステル化されていることを示していた. **17** は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **5** と **11** を 1:1 のモル比で与えた. 以上より, **17** を 2-feruloylfukiic acid 1-methyl ester と結論した (Fig. 12).

成分 **18** は, 微黄色粉末物として得られ, $[\alpha]_D +36.4^\circ$ を有する. その SIMS スペクトルにおいて m/z 463 に (M+H)⁺ イオンピークが認められ, HR-SIMS および ¹³C-NMR スペクトルデータよりその分子式を C₂₂H₂₂O₁₁ と決定した. ¹H-NMR スペクトルにおいて, **18** は cimicifugic acid B (**2**) と近似していたが, メトキシカルボニル基由来の 3H 相当の一重線が δ 3.70 に認められた. HMBC スペクトルにおいて, このピークには C-1 (δ 169.95) との間にクロスピークが存在し, C-5 (δ 174.69) とはクロスピークを持たないことより, C-1 のカルボキシル基がメチルエステル化されていることを示していた. **18** は, 2N 水酸化ナトリウムで加水分解すると, **5** と **12** を 1:1 のモル比で与えた. 以上より, **18** を 2-isoferuloylfukiic acid 1-methyl ester と結論した (Fig. 12).

成分 **15–18** は, 対応する cimicifugic acid E (**7**), F (**8**), cimifugic acid A (**1**) および B (**2**) の 1-モノメチルエステル体であるが, これらの成分は *C. simplex* 地下部のアセトン–水 (1:9) 抽出液中にも存在し, さらに, 他の *Cimicifuga* 属植物のアセトン–水抽出液中にも確認された. 従って, **15–18** は *Cimicifuga* 属植物に固有成分として含まれており, 抽出中に生成されたものでないと結論した (第四章).

Piscidic acid (**9**) は, fukiic acid (**5**) と同様にマメ科植物の根から分泌され, 低リン (P) 酸土壌からリン酸を植物内に取り込む時にキレート化合物として使われる水溶性成分として知られ, また睡眠誘導作用も報告されている²⁸⁾. これらの成分が升

Table 3. ¹H - NMR Spectral Data for **6–8** and **15–18**

Proton No.	6	7	8	15	16	17	18
H-2	5.62 br s	5.57 br s	5.63 br s	5.63 br s	5.63 br s	5.62 br s	5.63 br s
H-4	2.98 d (13.5)	2.97 d (13.6)	2.98 d (13.6)	2.95 d (13.5)	2.94 d (13.6)	2.92 d (13.6)	2.91 d (13.7)
	3.05 d (13.5)	3.03 d (13.6)	3.06 d (13.6)	3.09 d (13.5)	3.07 d (13.6)	3.05 d (13.6)	3.03 d (13.7)
COOCH ₃	—	—	—	3.70 s	3.70 s	3.69 s	3.70 s
H-2'	7.08 d (8.5)	7.10 d (8.4)	7.09 d (8.6)	7.08 d (8.4)	7.08 d (8.5)	6.75 d (2.2)	6.74 d (2.2)
H-3'	6.65 d (8.5)	6.64 d (8.4)	6.66 d (8.6)	6.65 d (8.4)	6.64 d (8.5)	—	—
H-5'	6.65 d (8.5)	6.64 d (8.4)	6.66 d (8.6)	6.65 d (8.4)	6.64 d (8.5)	6.64 d (8.2)	6.64 d (8.3)
H-6'	7.08 d (8.4)	7.10 d (8.6)	7.09 d (8.4)	7.08 d (8.5)	7.08 d (8.2, 2.2)	6.60 dd (8.3, 2.3)	6.60 dd (8.3, 2.3)
H-2''	6.39 d (16.0)	6.46 d (16.1)	6.46 d (15.9)	6.51 d (16.1)	6.46 d (16.0)	6.50 d (16.1)	6.46 d (16.0)
H-3''	7.70 d (16.0)	7.72 d (16.1)	7.73 d (15.9)	7.78 d (16.1)	7.74 d (16.0)	7.78 d (16.1)	7.74 d (16.0)
H-2'''	7.09 d (2.2)	7.23 d (2.3)	7.12 d (2.3)	7.22 d (2.3)	7.13 d (2.3)	7.24 d (2.3)	7.14 d (2.3)
H-5'''	6.80 d (8.5)	6.82 d (8.5)	6.96 d (8.3)	6.82 d (8.4)	6.96 d (8.4)	6.83 d (8.5)	6.96 d (8.3)
H-6'''	7.00 dd (8.5, 2.2)	7.10 dd (8.5, 2.3)	7.11 dd (8.3, 2.3)	7.12 dd (8.4, 2.3)	7.11 dd (8.4, 2.3)	7.12 dd (8.5, 2.3)	7.11 dd (8.3, 2.3)
OCH ₃	—	3.90 s	3.89 s	3.90 s	3.89 s	3.89 s	3.89 s

Chemical shifts are in δ values and are followed by multiplicities and J values (in Hz).

Table 4. ¹³C - NMR Spectral Data for **6–8** and **15–18**

Carbon No.	6	7	8	15	16	17	18
C-1	170.58	170.44	170.28	169.16	169.02	169.17	169.95
C-2	79.61	78.16	78.08	77.67	77.83	77.71	78.08
C-3	79.90	80.02	80.09	79.50	80.63	79.57	80.07
C-4	41.93	41.88	41.92	41.75	42.35	42.00	41.85
C-5	174.85	174.96	174.43	174.23	174.40	174.65	174.69
COOCH ₃	—	—	—	52.78	52.67	52.71	51.98
C-1'	127.66	127.96	127.57	127.38	127.32	127.77	127.47
C-2'	132.64	132.69	132.59	132.39	132.37	118.66	118.67
C-3'	115.78	115.68	115.77	115.64	115.53	145.47	145.37
C-4'	157.32	157.27	157.30	157.07	157.77	145.07	145.19
C-5'	115.78	115.68	115.77	115.64	115.53	115.74	115.67
C-6'	132.64	132.69	132.59	132.39	132.37	122.91	122.95
C-1''	168.31	168.38	168.09	167.90	167.76	167.90	167.81
C-2''	114.50	114.59	115.47	114.12	114.71	114.14	114.90
C-3''	148.08	148.03	147.68	148.17	147.63	148.15	147.72
C-1'''	127.85	128.18	128.96	127.31	128.68	127.43	128.59
C-2'''	115.31	111.94	114.96	111.62	114.44	111.66	115.26
C-3'''	146.89	149.43	148.09	149.16	147.81	149.19	148.01
C-4'''	149.82	150.82	151.72	150.65	151.50	150.69	151.75
C-5'''	116.60	116.52	112.65	116.35	112.48	116.36	112.31
C-6'''	123.20	124.26	122.99	123.01	122.96	124.31	122.95
OCH ₃	—	56.55	56.44	56.47	56.36	56.44	56.40

麻の主要生理活性成分である caffeic acid, ferulic acid および isoferulic acid とのエステル誘導体として、含率高く (第四章) *Cimicifuga* 属植物から単離されたことは興味深い。

第三節 その他の水溶性芳香族成分の単離と構造

新規成分である cimicphenol (19) の構造決定, そして2種のクロモン配糖体 (20, 21), 2種のフラボノール配糖体 (22, 23), eucomic acid (24), hydroxyeucomic acid (25) および chlorogenic acid (26) の同定について述べる。

Cimicphenol (19) は, 分取用 HPLC において最末尾附近に溶出され, 微黄色針状結晶として得られた (Fig. 4) . 19 は, 融点 159-160°, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 327 nm を有し, SIMS スペクトルにおいて m/z 359 に (M+H)⁺ イオンピークが認められ, HR-SIMS および ¹³C-NMR スペクトルデータよりその分子式を C₁₉H₁₈O₇ と決定した. ¹H-NMR スペクトルにおいて, 3,4-ジヒドロキシフェニル-2-オキソプロピル基 (δ 3.63, 2H, br s, H-3; δ 4.87, 2H, br s, H-1; δ 6.68, 1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'; δ 6.58, 1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-6'; δ 6.73, 1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5') およびイソフェルロイル基 (δ 6.36, 1H, d, $J=16.2$ Hz, H-2"; δ 7.60, 1H, d, $J=16.2$ Hz, H-3"; δ 3.89, 3H, s, OCH₃; δ 7.08, 1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'''; δ 7.06, 1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-6'''; δ 6.94, 1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5''') の存在が示唆さ

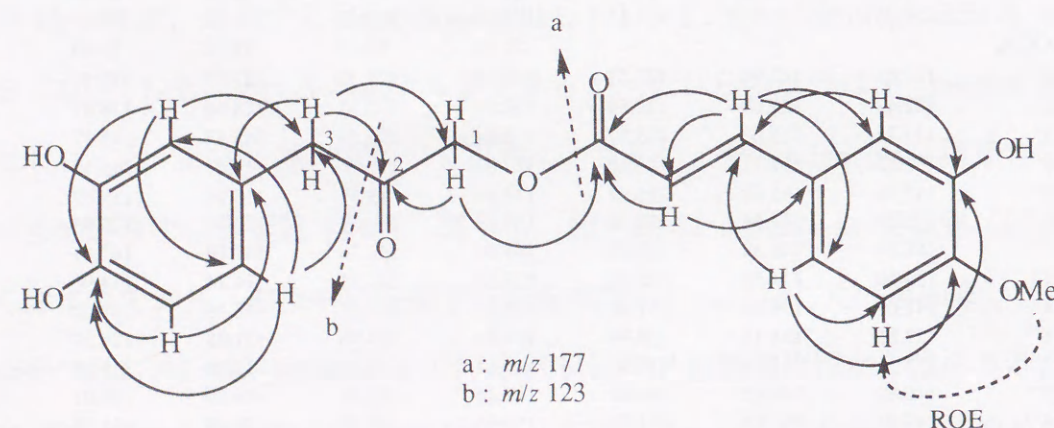


Fig. 13. MS spectral fragment ions, HMBC correlation and ROE of 19.

れた. また, イソフェルロイル基の存在は, メトキシ基 (δ 3.89) と H-5''' とに ROE が観察されたことから支持された (Fig. 13) . また, ¹³C-NMR スペクトルでは, 1 個のエステルカルボニルカーボン (δ 168.44) と, 1 個のカルボニルカーボン (δ 204.86) に相当するピークが認められ, SIMS スペクトルにおける m/z 177 と 123 のフラグメントイオンピークは, 各々イソフェルロイル基と 3,4-ジヒドロキシベンジル基に帰属され, 19 がこれらのエステル化合物であると推定された. 一方, HMBC スペクトルにおいて H-1 (δ 4.87) と C-1'' (δ 168.44), H-1 と C-2 (δ 204.86) および H-3 (δ 3.63) と C-2 の間にクロスピークが存在することによりイソフェルロイル基が 19 の C-1-O に結合していることが明らかとなった. 以上より, 19 の構造を 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxopropyl isoferulate と結論した (Fig. 13) .

一方, 成分 20-23 および cimifugin は, ODS カラムクロマトでの MeOH-H₂O (2:1) 溶出部を塩酸酸性下酢酸エチル抽出後, その水層を HP-20 カラムクロマトに通導し, MeOH-H₂O (5:1-1:0) 溶出画分を分取用 HPLC に付すことで得られた (Fig. 3) . これらの成分は, 各種スペクトルデータおよび酸加水分解反応, 糖分析により

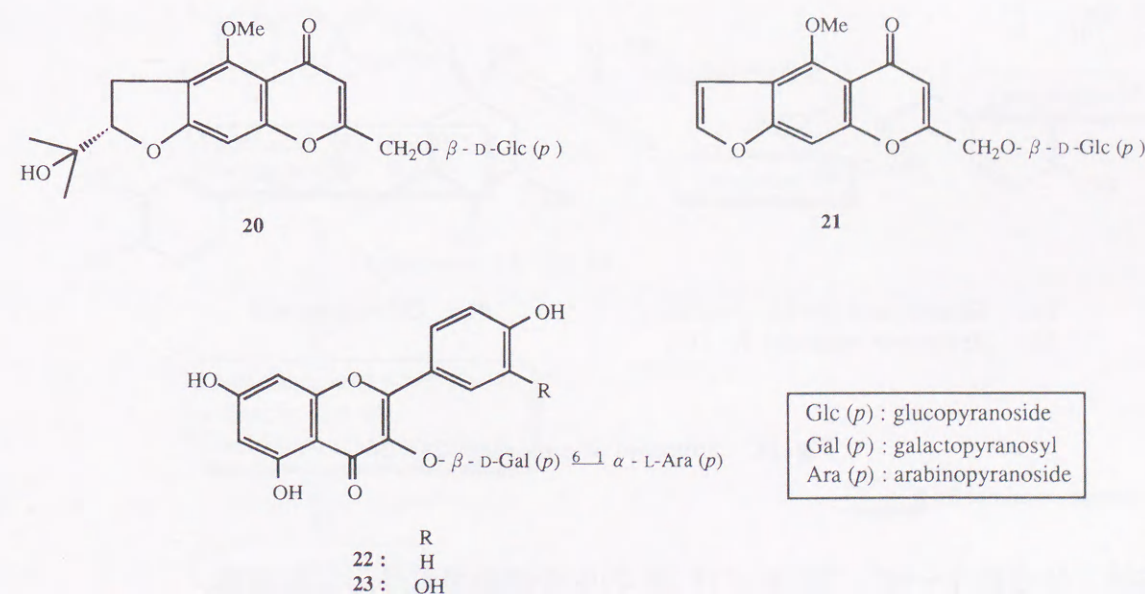


Fig. 14. Structures of compounds 20-23.

各々 *prim-O*-glucosylcimifugin (**20**)²⁹⁾, *prim-O*-glucosylkhellol (**21**)³⁰⁾, kaempferol 3-*O*- β -D-galactopyranosyl $\underline{6-1}$ α -L-arabinopyranoside (**22**)³¹⁾ および quercetin 3-*O*- β -D-galactopyranosyl $\underline{6-1}$ α -L-arabinopyranoside (**23**)³²⁾ と推定し, それぞれのスペクトルデータを文献値と比較し一致した. 以上より, 各々の化合物を **20–23** と同定した (Fig. 14). **20** と **21** のアグリコンである cimifugin と khellol は共に *C. simplex* からの単離が報告されているが, 配糖体としての単離は初めてである. また, **22** と **23** は各々 *Trillium tschonoskii*³¹⁾, *Hydrocotyle vulgaris* L.³²⁾ から得られたもので, *Cimicifuga* 属より単離・同定されたのは今回が初めてである.

一方, 微量成分として eucomic acid (**24**), hydroxyeucomic acid (**25**) および chlorogenic acid (**26**) が, サラシナショウマ地下部の水溶性成分として HPLC 分析によりその存在が確認された (Fig. 15). **24** と **25** は, *Cattleya trianaei* (カトレア: ラン科 Orchidaceae) の成分として初めて単離された化合物であるが³³⁾, cimicifugic acid A–F や cimiciphénol の生合成の重要な中間体と考えられる (第4節). また **26** は, caffeic acid 関連成分を含む多くの植物に分布することが知られているが, サラシナショウマもそのような植物の一種であることが示唆される.

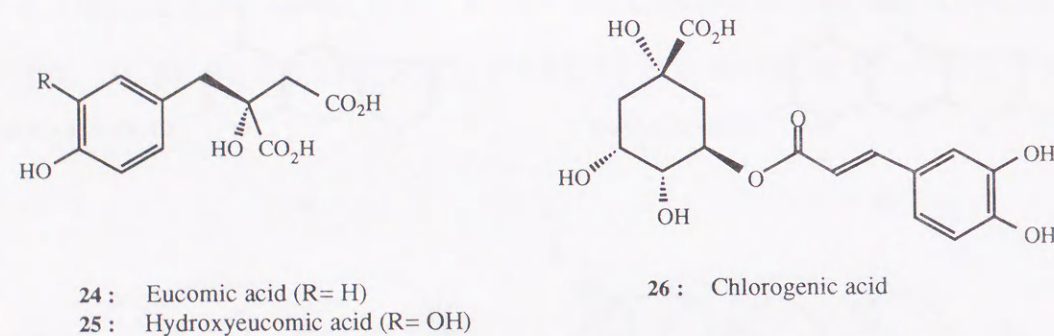


Fig. 15. Structures of compounds **24–26**.

第四節 化合物 1–19, 24 および 25 の生合成経路についての考察

Caffeic acid 類 (**10–15**) は, ベンゼン核 (C-6, phenyl) に直鎖状 3 炭素 (C-3, propane) が結合したもので, いわゆるフェニルプロパノイドと呼ばれる. これらの成分は, シ

キミ酸経路により生合成された phenylalanine または tyrosine が酵素変換され形成されることが考えられる³⁴⁾. 一方, cimicifugic acid A–C (**1–3**), D–F (**6–8**) および関連成分の生合成経路は次のように考えられる. まず, シキミ酸経路の合成中間体である *p*-hydroxyphenylpyruvic acid (= α -keto acid) と, acetyl-CoA から生成する hydroxyeucomic acid (**25**) または eucomic acid (**24**)^{27-b)} が酸化され, 各々 fukiic acid (**5**) および piscidic acid

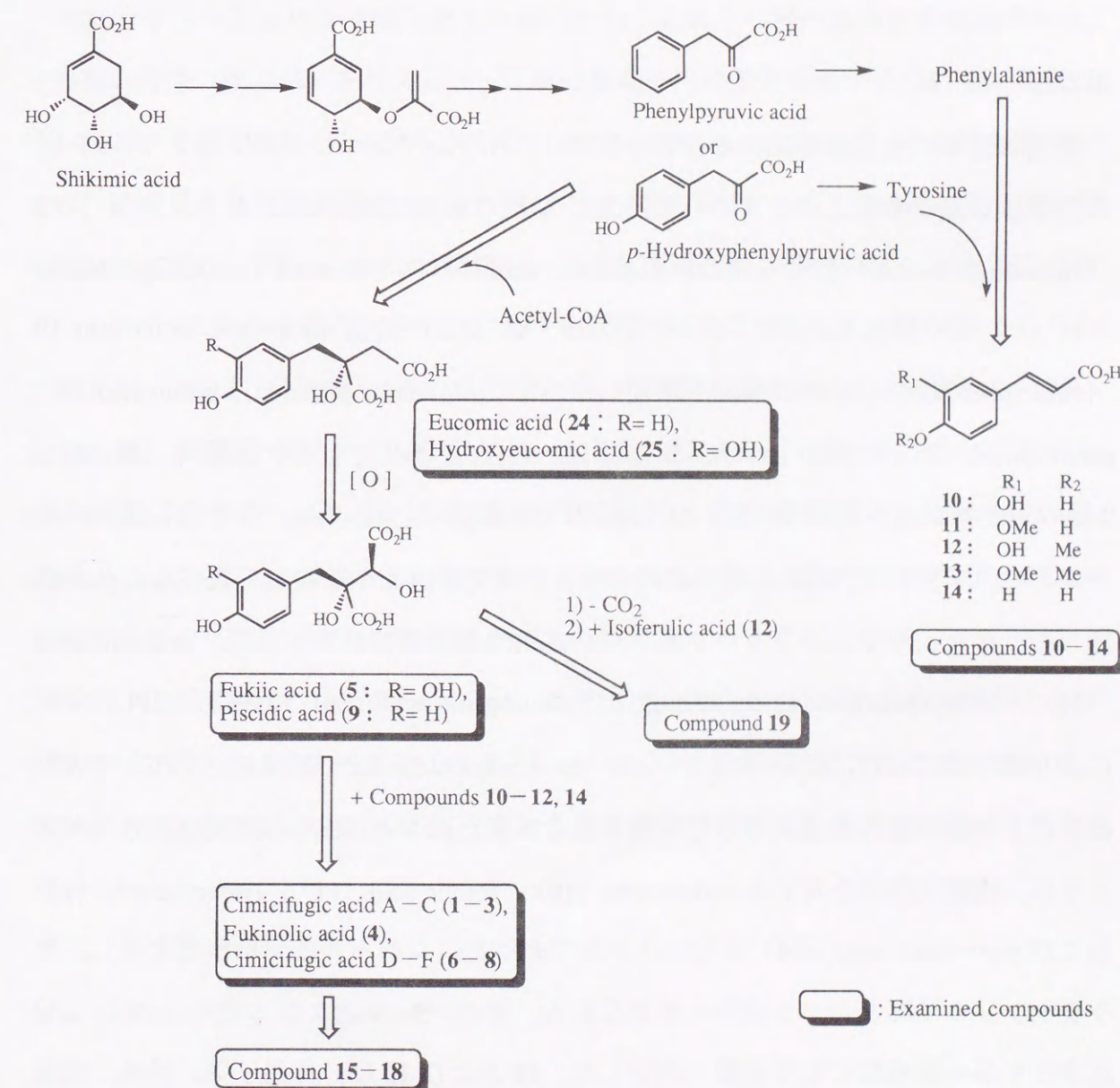


Fig. 16. Hypothetical biogenetic correlation of compounds **1–19**, **24** and **25**.

acid (9) が生成する。続いて 5 および 9 が 10-12, 14 とエステル化して 1-4 および 6-8 が、さらに 7, 8 および 1, 2 のカルボキシル基がメチル化を受け 15-18 が生成されることが考えられる。また, cимициphenol (19) は, fukiic acid (5) が脱炭酸後, アルコール部分が isoferulic acid (12) とエステル結合して生合成されることが考えられる (Fig. 16)。サラシナショウマ中に 24 および 25 が確認されたことより, 本生合成経路の存在が明らかとなった。

第五節 小 結

筆者は升麻の生物活性成分の探索を目的に, サラシナショウマ地下部より, 23 種の芳香族成分を単離した。それらのうち, 3 種の新規 fukiic acid のエステル 1-3 (cimicifugic acid A-C), 3 種の新規 piscidic acid のエステル 6-8 (cimicifugic acid D-F), 4 種の新規モノメチルエステル 15-18 および新規 oxopropyl isoferulate 19 (cimiсiphenol) については構造を決定した。また, fukinolic acid (4), fukiic acid (5), piscidic acid (9), 5 種の caffeic acid 類 (10-14), 2 種のクロモン配糖体 (20, 21), 2 種のフラボノール配糖体 (22, 23) および cimifugin については, 各々の各種スペクトルデータを解析し, 標品と直接比較しあるいは文献値と比較して一致することを確認した。また, サラシナショウマ地下部の水溶性の芳香族成分として, eucomic acid (24), hydroxyeucomic acid (25) および chlorogenic acid (26) の存在を HPLC 分析により明らかにした。これらのうち, 1-4, 6-8 および 15-18 は, いずれもマメ科植物のリン酸の吸収促進成分として知られる 5 または 9 と, 升麻の抗炎症成分の本体とされ, 抗酸化作用を有する caffeic acid (10), ferulic acid (11), isoferulic acid (12) および *p*-coumaric acid (14) とのエステルであった。これらの成分は渋味を有し, サラシナショウマのタンニン成分と考えられる。また, 5, 9 および 5 種の caffeic acid 誘導体を各々遊離酸として単離・同定した。11 および 12 は, 体温下降, 解熱, 鎮痛, 浮腫抑制作用などを有し, マウスにおける interleukin-8 産生抑制により, 升麻属植物の主要な薬理作用である抗炎症作用発現の本体の成分とされる¹⁴⁾。また, 関升麻 (*C.*

heracleifolia) 煎剤の抗炎症作用の本体が 12 のナトリウム (Na) 塩であることが報告されている^{17-b)}。さらに, caffeic acid 誘導体は植物成分として天然界に広く存在し, 抗酸化, 抗炎症, 抗アレルギー作用などの様々な生物活性を有する。Caffeic acid 誘導体を高い含率で含む多くの生薬 (crude drugs) は, 化粧品として皮膚の保護に用いられ, さらに食品脂質の過酸化を阻止し, 過酸化物によって引き起こされる種々の潰瘍性の疾患に効果を示すと考えられる^{17-c)}。

今回サラシナショウマ地下部より得られた, これら一群の水溶性芳香族成分は, その高い含率 (第四章) を考えると, 升麻の薬理作用の主体をなす成分として位置付けられる。また 19 は, 先にフキからその caffeoyl 体 (petasiphenol)³⁵⁾ が得られているが, 抗変異原性作用が報告されている。また, クロモンである cimifugin には中枢神経抑制作用が, 同 khellol には抗酸化, 抗脂質変成および解熱作用などが報告されている³⁶⁾。これら 2 種のクロモンの各々の配糖体である 20 および 21 は, それらのプロドラックとして位置付けられる。さらに, 今回新たに *Cimicifuga* 属植物より見出された, 2 種のフラボノール配糖体 22 および 23 は, 植物界に広く分布する kaempferol および quercetin の配糖体であるが, その糖配列 (galactopyranosyl-arabinopyranoside) は類例がきわめて少く, また, *Cimicifuga* 属植物からのフラボノイド単離は極めて珍しい例として特筆される³¹⁾。

一方, 24 と 25 は cimicifugic acid A-F および cimiсiphenol の生合成中間体として位置付けることができ, また chlorogenic acid (26) の存在が確認されたことにより, サラシナショウマが caffeic acid 関連成分を含む植物の仲間であることが示唆される。

第四章 6種のショウマ (*Cimicifuga*) 属植物に含まれる 水溶性芳香族成分

サラシナショウマ地下部から得られた水溶性芳香族成分を用いて、3種の日本産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica*) の地下部および3種の中国産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. heracleifolia*, *C. foetida*, *C. dahurica*) の根茎の、水-メタノールあるいは水-アセトン抽出エキス中に含まれる成分について、比較分析した。本章では、これら6種の *Cimicifuga* 属植物に含まれる芳香族成分の比較について詳述する。

第一節 *Cimicifuga* 属植物の23種の水溶性芳香族成分

第一項 試料の調整および分析法

サラシナショウマ地下部から得られた23種の水溶性芳香族成分 **1**–**23** (Fig. 2) について、同時定量分析の条件を検討し、HPLC 分析条件 A で良好な分離が認められた (Fig. 19: Condition A)。一方、成分 **12**, **21** および **23** は、この条件では分離されなかったため、成分 **4** の検量曲線に従って定量した。この分析条件 A により、6種8検体の *Cimicifuga* 属植物すなわち *C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica*, *C. heracleifolia* (1), *C. heracleifolia* (2), *C. foetida*, *C. dahurica* (1) および *C. dahurica* (2) の地下部または根茎に含まれる芳香族成分について、サラシナショウマより得られた成分 **1**–**23** を標品に用いて比較した。

基原の明確な上記6種8検体の *Cimicifuga* 属植物の乾燥した地下部または根茎を、各々粉末とし、各1グラムを水-メタノール (1:1) または水-アセトン (9:1) で室温1時間攪拌・抽出した。抽出溶液を濾過後、Sep-Pak C18 カートリッジカラム (日本ウォーターズリミテッド, 東京) に通導し、通過液を一定量に希釈して HPLC 分析用試料とした。また、同時定量のための分析条件 A として、HPLC のカラムには芳香族化合物に対する保持力が高いシリカゲル表面にフェニルエチル基のついた充填剤を有するコスモシル 5PE-MS を用い、また移動相にはアセトニトリル-1% 酢酸水を用い

5% → 27% 直線グラジエントで溶出した。また、この分析条件 A とは別に、分析条件 B (Fig. 20: Condition B) を設定し、水系に溶出されやすい成分である **5**, **9** および **10** の比較定量を行った。成分 **1**–**23** の検出は主に 254 nm の吸光度を用い、成分 **5**, **9** および **10** については 280 nm の吸光度を用いた。また、各成分の定量は標準化合物のピーク面積による2点検量線法を用いた。

第二節 芳香族成分の比較

サラシナショウマ地下部より得られた23種の水溶性芳香族成分は、6種8検体の *Cimicifuga* 属植物に、その大多数を共通する水溶性成分として見出すことができた。それらの中で特に fukinolic acid (**4**), cimicifugic acid A (**1**), B (**2**), D (**6**), E (**7**) および F (**8**) は、8検体すべての試料に主要成分として含まれていた (Figs. 17–19 および Table 5)。成分 **4** は、4種6検体の *C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica*, *C. heracleifolia* (1), *C. heracleifolia* (2) および *C. foetida* において最大の成分含量を示し、1.55–3.55% の含率であった。一方、*C. dahurica* (1) および *C. dahurica* (2) には、成分 **2** と **8** が 0.85–2.34% と多く含まれるが、逆に **4** と **1** は、0.32% 以下と低い含率であったことは特筆される。成分 **2** と **8** は *C. dahurica* を特徴付ける指標成分として期待される。成分 **6** は、*C. acerina* に 1.18% と多く含まれ、**4** の 3.54% に続いて高い含率を示した。また成分 **6** は、他の検体では最大で *C. japonica* の 0.56% 以下の含率であるため、*C. acerina* を識別する上での有力な指標成分となり得るものと考えられる。また、成分 **7**, **8**, **1** および **2** のそれぞれのモノメチルエステル体である成分 **15**–**18** は、8検体のほぼすべてに共通成分として見い出されたが、その含率はすべての検体において 0.45% 以下であり、成分 **1**, **2**, **4** および **6**–**8** に比べると極めて僅かであった。また成分 **15**–**18** は、水-メタノールおよび水-アセトンの両者の抽出液中に、それぞれほぼ等含率で見い出されたことから *Cimicifuga* 属植物の固有成分と考えられる (第三章)。一方、cimiciphenol (**19**) は、*C. acerina* に 0.13% と比較的多く含まれていたが、他の5種7検体の *Cimicifuga* 属植物においてはすべて 0.04% 以下で

あり、微量成分として位置付けることができる。また、成分 **1–23** 以外に数種の未同定成分が、中国産升麻である 3 検体 *C. heracleifolia* (1), *C. dahurica* (1) および *C. dahurica* (2) に認められ、**1–23** との生合成的な関連も含めて今後の検索が待たれる。

さらに、これら 6 種 8 検体の *Cimicifuga* 属植物について、分析条件 B を用い、成分 **1–23** に比べより水溶性の高い成分である fukiic acid (**5**), piscidic acid (**9**) および caffeic acid (**10**) の 3 成分について比較定量分析を行った。いずれの化合物も、6 種 8 検体の *Cimicifuga* 属すべての共通成分として見い出された (Fig. 20 および Table 5)。成分 **5** の含率は、*C. dahurica* (1) がやや低いものの、他の検体では約 0.20% 前後ではほぼ安定していた。しかし、成分 **9** のそれは 0.03–0.45% と変動があるものの、*C. acerina* と *C. heracleifolia* (2) で各々 0.45% および 0.23% と、8 検体の中では比較的高い含率を示したことが特筆される。一方、成分 **5** および **9** は、成分 **1–4** および **7–9** の生合成前駆体であるが、それぞれの成分比較における両者の相関については明確とはならなかった。

第三節 小結

日本産サラシナショウマ地下部より得られた 23 種の水溶性芳香族成分の同時定量条件を用いて、6 種 8 検体の *Cimicifuga* 属植物に含まれる芳香族成分を比較定量した。

その結果、芳香族成分 **1–23** の大多数が、6 種 8 種検体に共通成分として含まれていた。特に、fukinolic acid (**4**), cimicifugic acid A (**1**), B (**2**), D (**6**), E (**7**) および F (**8**) は、すべての検体に高い含率で含まれ、升麻の基原を識別する上で特徴的な成分として位置付けることができる。また、成分 **2** と **8** が *C. dahurica* を、そして成分 **6** は、*C. acerina* を他の *Cimicifuga* 属植物と識別する上でそれぞれ重要な指標化合物となり得るものと考えられる。

現在、升麻の市場は 3 種の中国産升麻 *C. heracleifolia*, *C. foetida* および *C. dahurica* であり、升麻の外部形態は酷似しているため基原植物の識別は難しく、異物同名の生薬が多いとされる²⁰⁾。従って、局方は基原植物の鑑別法や確認試験法を規定しない

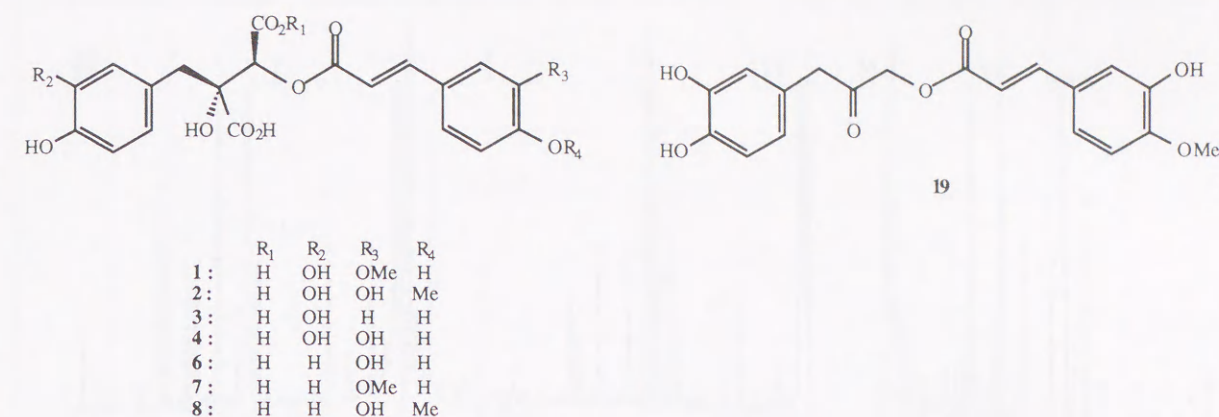


Fig. 17. Structures of phenolic compounds from *Cimicifuga* species.

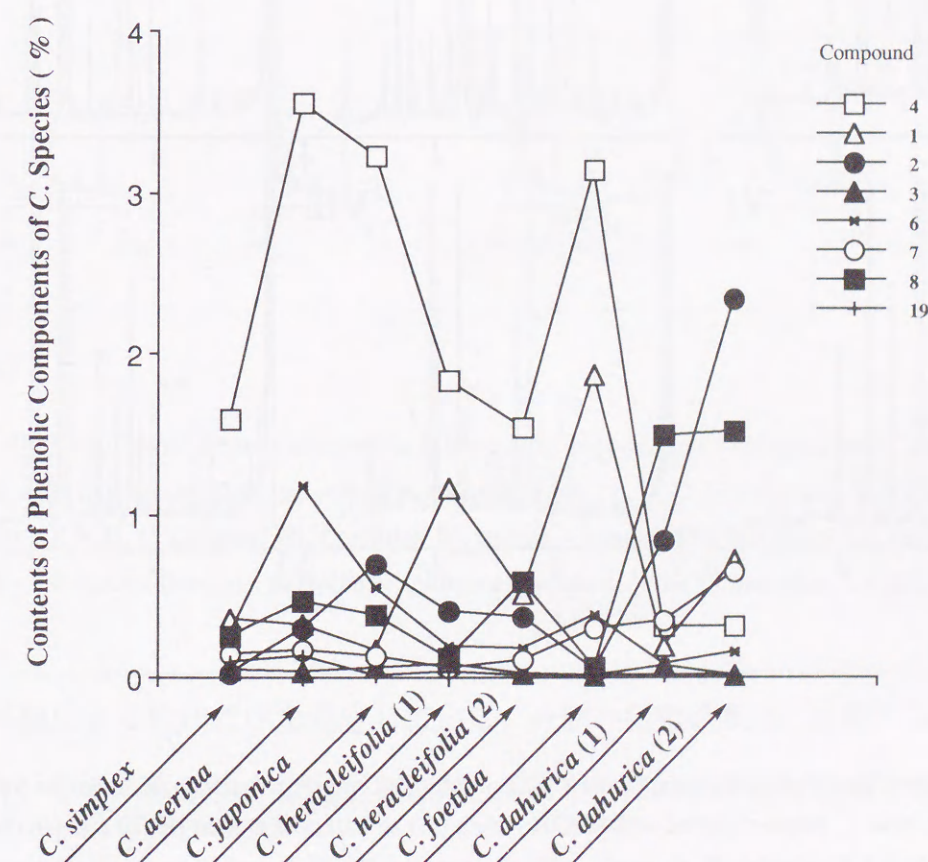


Fig. 18. Contents of phenolic compounds (**1–4**, **6–8** and **19**) of *Cimicifuga* (C.) species.

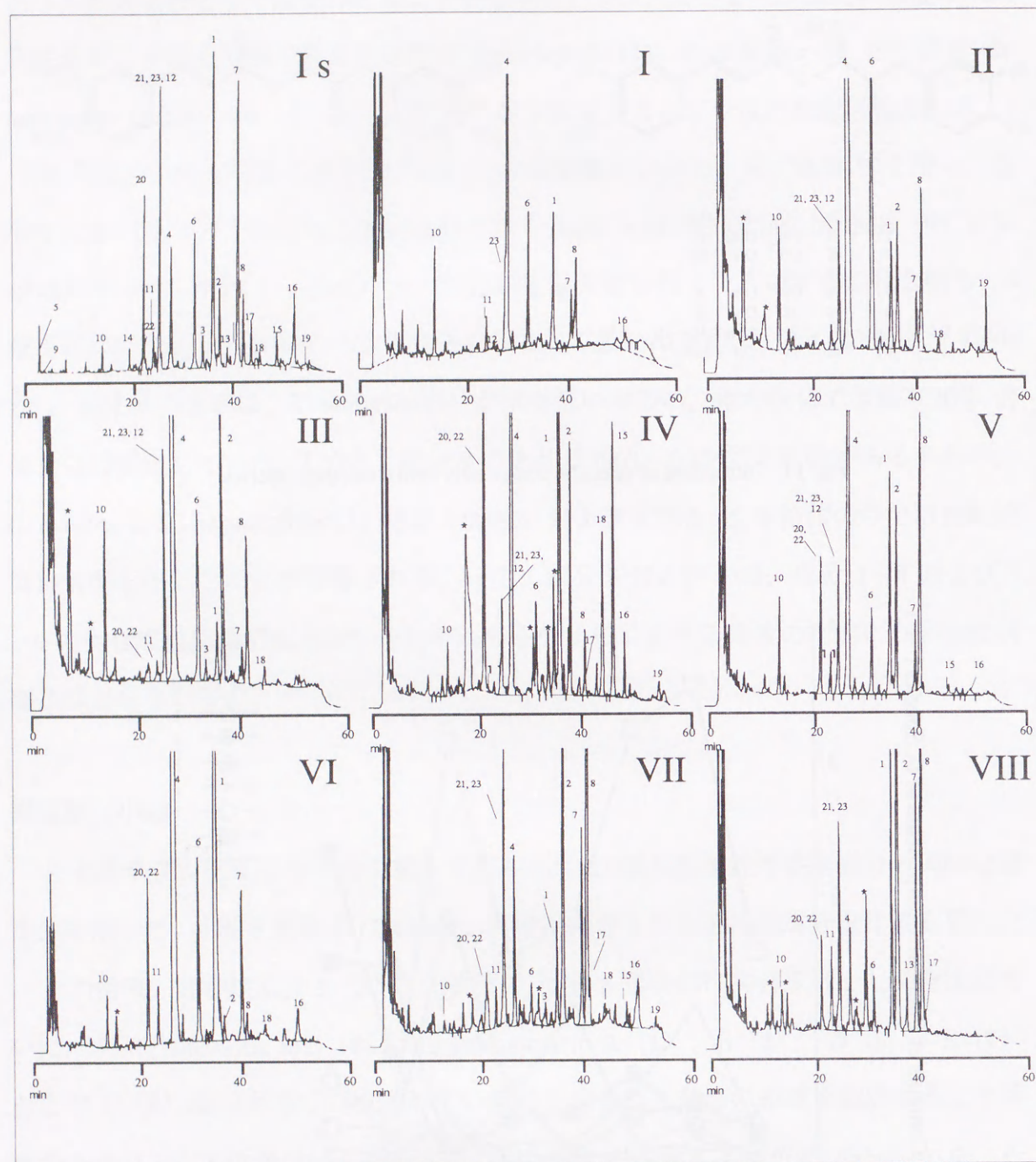


Fig. 19. HPLC profiles of phenolic compounds 1–23 of dried rhizomes of *Cimicifuga* (C.) species. Sample: I s, standard fraction from *C. simplex* [eluted with MeOH–H₂O (5:1 to 1:0) on a Diaion HP-20 column chromatography (see Fig. 3.)]; I, *C. simplex*; II, *C. acerina*; III, *C. japonica*; IV, *C. heracleifolia* (1); V, *C. heracleifolia* (2); VI, *C. foetida*; VII, *C. dahurica* (1); VIII, *C. dahurica* (2). Condition A : column, Cosmosil 5PE-MS (4.6 × 150 mm); mobile phase, MeCN–1% AcOH (5→27% 50 min, linear gradient); flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, 40 ± 1 °C; detection, UV 254 nm. * : unidentified peak.

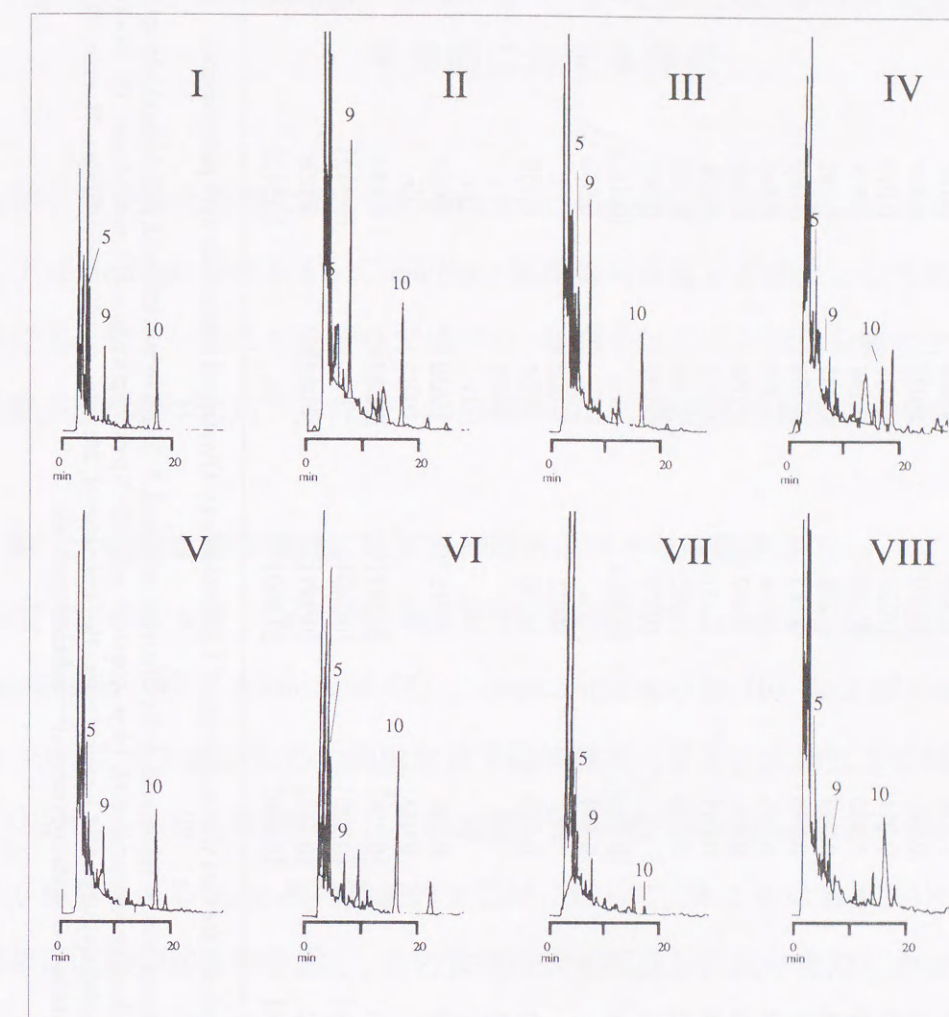


Fig. 20. HPLC profiles of phenolic compounds 5, 9 and 10 of dried rhizomes of *Cimicifuga* (C.) species. Sample: I, *C. simplex*; II, *C. acerina*; III, *C. japonica*; IV, *C. heracleifolia* (1); V, *C. heracleifolia* (2); VI, *C. foetida*; VII, *C. dahurica* (1); VIII, *C. dahurica* (2). Condition B : column, Cosmosil 5PE-MS (4.6 × 150 mm); mobile phase, 5% MeCN–1% AcOH; flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, 40 ± 1 °C; detection, UV 280 nm.

まま、外観による性状だけを規定している。今回の研究結果は、升麻の確認試験法だけでなく、その基原植物を識別する有力な手段として利用可能であると考えられる。

Table 5. Contents of Water-Soluble Phenolic Compounds 1-23 of Dried Rhizomes of *Cimicifuga* (C.) Species

Species Japanese name Compound ^{a)}	<i>C. simplex</i> Sarasina shoma	<i>C. acerina</i> Ooba shoma	<i>C. japonica</i> Inu shoma	<i>C. heracleifolia</i> (1) Seki shoma	<i>C. heracleifolia</i> (2) Seki shoma	<i>C. foetida</i> Nishi shoma	<i>C. dahurica</i> (1) Kita shoma	<i>C. dahurica</i> (2) Kita shoma
1	0.360	0.322	0.172	1.176	0.519	1.869	0.188	0.730
2	0.027	0.303	0.701	0.411	0.370	0.051	0.846	2.342
3	0.050	0.038	0.057	0.081	0.026	tr.	0.070	tr.
4	1.593	3.547	3.226	1.840	1.549	3.148	0.314	0.316
5	0.262	0.159	0.278	0.247	0.298	0.241	0.092	0.205
6	0.264	1.179	0.557	0.196	0.185	0.383	0.080	0.154
7	0.145	0.173	0.134	0.056	0.114	0.303	0.346	0.654
8	0.265	0.475	0.391	0.122	0.592	0.056	1.502	1.524
9	0.154	0.447	0.046	0.041	0.231	0.074	0.028	0.144
10	0.077	0.124	0.162	0.050	0.093	0.166	0.030	0.124
11	0.029	0.027	0.032	tr.	0.071	0.095	0.061	0.276
12	0.016	[0.306]	[0.536]	[0.220]	[0.240]	tr.	[0.512]	[0.654]
13	tr.	tr.	tr.	0.149	tr.	tr.	0.032	0.058
14	tr.	tr.	tr.	tr.	0.011	0.026	tr.	0.036
15	tr.	tr.	0.027	0.450	0.033	0.033	0.032	tr.
16	0.037	0.033	0.021	tr.	tr.	0.109	tr.	tr.
17	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	0.020
18	tr.	0.043	0.058	0.208	0.015	0.030	0.024	tr.
19	tr.	0.128	tr.	0.038	tr.	0.015	tr.	tr.
20	0.037	N.D.	0.094	[0.718]	[0.247]	[0.282]	0.184	0.242
21	0.016	[0.306]	[0.536]	[0.220]	[0.240]	tr.	[0.512]	[0.654]
22	0.039	0.037	0.082	[0.718]	[0.247]	[0.282]	0.058	0.024
23	0.146	[0.306]	[0.536]	[0.220]	[0.240]	tr.	[0.512]	[0.654]

The contents are shown as percentage value of the dry weight of the C. species and the data was an average of 3 determinations. Overlapped compounds were parenthesized.

N.D.: not detected, tr.: trace.

a) 1: cimicifugic acid A, 2: cimicifugic acid B, 3: cimicifugic acid C, 4: fukinolic acid, 5: fukiic acid, 6: 2-caffeoylpiscidic acid, 7: 2-feruloylpiscidic acid, 8: 2-isoferyliscidic acid, 9: piscidic acid, 10: caffeic acid, 11: ferulic acid, 12: isoferyliscidic acid, 13: 3,4-dimethoxycinnamic acid, 14: p-coumaric acid, 15: 2-feruloylpiscidic acid 1-methyl ester, 16: 2-isoferyliscidic acid 1-methyl ester, 17: 2-feruloylfukiic acid 1-methyl ester, 18: 2-isoferyliscidic acid 1-methyl ester, 19: cimiciphinol, 20: prim-O-glucosylcimicifugin, 21: prim-O-glucosylcimicifugin, 22: kaempferol 3-O-galactopyranoside, 23: quercetin 3-O-galactopyranoside.

第五章 Cimicifugic acid および関連化合物の大動脈血管平滑筋に対する作用

水溶性芳香族化合物である fukinolic acid, cimicifugic acid A-B, cimicifugic acid D および cimicifugic acid E が, *Cimicifuga* 属植物に共通する成分として同属植物に高い含率で含まれていることを前章で述べた. 本章ではこれらの化合物のラット摘出大動脈血管平滑筋標本に対する作用, 作用機序および構造活性相関について詳述する.

第一節 大動脈血管平滑筋に対する作用およびその作用機序

第三章でサラシナショウマの地下部より単離した cimicifugic acid A-C (1-3), fukinolic acid (4), fukiic acid (5), cimicifugic acid D (6) および cimicifugic acid E (7) の, ラット摘出胸部大動脈血管平滑筋標本 (以下, 大動脈または大動脈血管と略) に対する作用を検討した. その結果, 大動脈の norepinephrine (以下, NE と略) により誘発される tonic 相の持続的な収縮に対して, 4 と 6 は各々 3.0×10^{-4} M の濃度で顕著な収縮抑制作用を示し, この作用は大動脈血管内皮の有無にかかわらず認められた. また, その作用機序は, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害によるものではなく, 受容体依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害によるものと考えられる. また, この大動脈に対する作用には, fukiic acid または piscidic acid にエステル結合する caffeic acid 部分が重要な役割を果たしていることが明らかとなった. また, 4 と 6 以外の化合物, すなわち 1, 2, 5 および 7 は各々 3.0×10^{-4} M の濃度で大動脈に対して作用を示さなかった. 一方, 3 は $1.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ M の濃度で大動脈の収縮作用を示し, その作用は用量依存的であった.

第一項 はじめに

Cimicifuga (C.) 属植物成分の生物活性については, 骨吸収亢進抑制作用¹⁵⁾, 炎症作用¹⁷⁾, リンパ球増殖抑制作用¹⁶⁾ などが報告されている. Genazzani らは, アメリカシヨウマ (*C. racemosa*) のクロロホルム可溶部より血圧降下作用のある成分を得,

acteina と名付けたが、その純度や化学構造等報告されていない³⁷⁾。また、Chang らは関升麻 (*C. heracleifolia*) および北升麻 (*C. dahurica*) の水抽出エキ스가、カエルの骨格筋の収縮を抑制し、心臓の収縮を高めることを報告している³⁸⁾。さらに、永井らは、*Salvia miltiorrhiza* (シソ科: Labiatae) から単離したカテコール基を有する 8-*epi*-blechnic acid が、NE により誘発されるラット摘出大動脈標本の収縮に対して、強い収縮抑制作用を示すことを報告している³⁹⁾。今回サラシナショウマ地下部より得られた芳香族化合物 1-7 は、いずれもカテコール基を有しており、大動脈に対する作用に興味を持たれた。

第二項 Fukinolic acid および cimicifugic acid D の大動脈に及ぼす作用

NE はラット大動脈に対して、初期収縮 (phasic 相) 後の tonic 相を通して長い持続性の収縮を誘発する。Fukinolic acid (4) と cimicifugic acid D (6) を各々 3.0×10^{-4} M の濃度で前投与すると、NE (1.0×10^{-7} M) により誘発される大動脈の収縮は phasic 相よりも tonic 相がより顕著に抑制された。また、この収縮抑制効果は、大動脈血管内皮の有無にかかわらず認められた (Figs. 21-23)。さらに、NE (1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-7} M) により誘発される phasic 相の収縮は用量依存的であるが、この収縮に対する 4 および 6 の各々 3.0×10^{-4} M の濃度での収縮抑制作用は、前者 (4) では NE の 1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-7} M の濃度で、後者 (6) では NE の 1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-7} M の濃度で有意に認められた (Fig. 22)。一方、4 および 6 の代わりに、caffeic acid (10) を 3.0×10^{-4} M の濃度で前投与すると、phasic 相および tonic 相を通して弱い収縮作用が示すが、この収縮は NE の投与により影響を受けなかった。

4 および 6 は、NE により誘発される大動脈の収縮に対して収縮抑制作用を示すが、その作用機序を調べるため、両化合物の Ca^{2+} による大動脈の収縮に及ぼす影響を検討した。電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (voltage-dependent Ca^{2+} -channels: 以下、VDC と略) ブロッカーである nicardipine (1.0×10^{-6} M) 存在下、両化合物は共に NE の累積的投与により誘起される大動脈の収縮に対して収縮抑制作用を示し、4 には 3.0×10^{-4} M の濃度で 90%、6 には 3.0×10^{-4} M の濃度で 80% の抑制効果がそれぞれ認められた (Fig.

24)。一方、両化合物は、prazosin (α_1 -受容体遮断薬) 存在下、高濃度 K^+ (40 mM) による大動脈の収縮に対しては影響を与えなかった (Fig. 25)。これらの結果より、両化合物の NE により誘発される大動脈の収縮に対する抑制作用は、VDC に非感受性の受容体依存性 Ca^{2+} チャンネル (receptor-operated Ca^{2+} -channels: 以下、ROC と略) を介した細胞内への Ca^{2+} の流入阻害であることが示唆される。

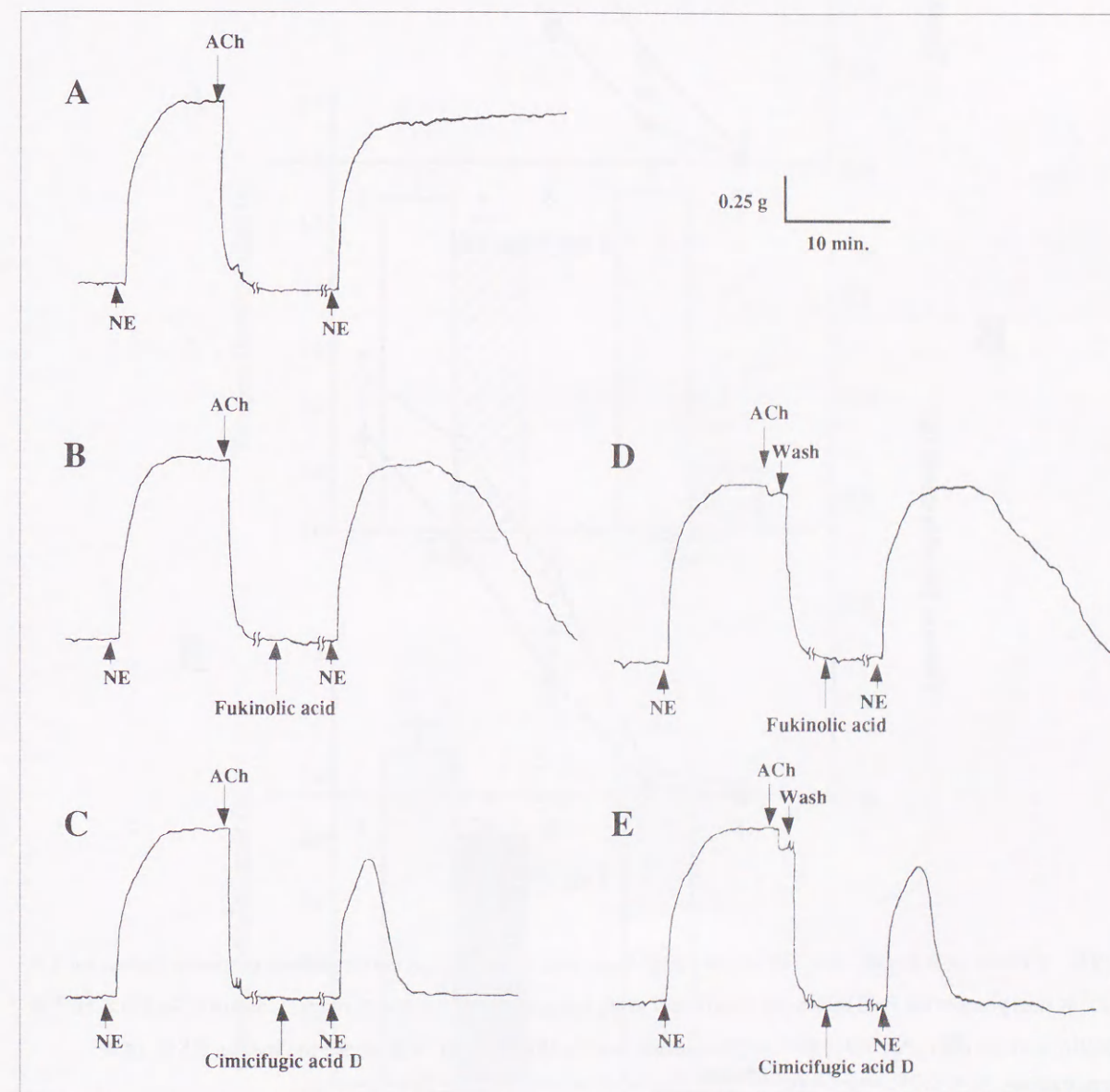


Fig. 21. A typical example of the 1.0×10^{-7} M norepinephrine (NE)-induced contraction of rat aortic strips with (A-C) or without (D, E) endothelium. Control (A); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (B); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (C); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (D); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (E).

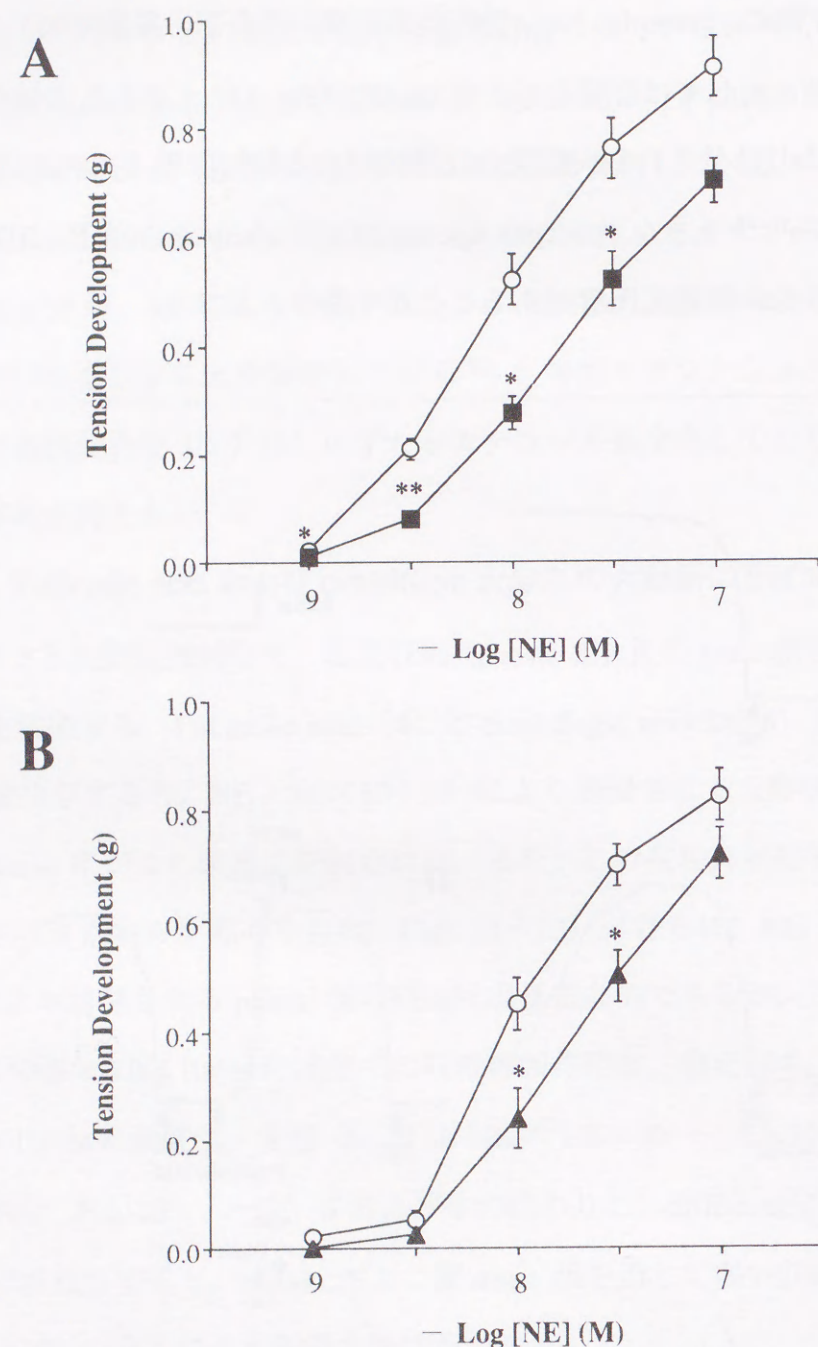


Fig. 22. Effects of fukinolic acid (4) (A) or cimicifugic acid D (6) (B) on concentration response curves for 1.0×10^{-7} M norepinephrine (NE)-induced phasic and tonic contraction of rat aortic strips. Control (○); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (■) (A); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (▲) (B). Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

一方、 Ca^{2+} フリーの溶液中で、NE (1.0×10^{-6} M) と nicardipine (1.0×10^{-5} M) を前投与した大動脈は、 Ca^{2+} の累積的投与により用量依存的に収縮するが、この収縮は 4

(3.0×10^{-4} M) および 6 (3.0×10^{-4} M) の投与により顕著に抑制された (Fig. 26). このことは先の実験と同様に、両化合物が NE により誘発される大動脈血管細胞内への Ca^{2+} 流入による収縮を、VDC ではなく ROC で阻害していることを支持している. 一方、両化合物は高濃度 K^{+} (60 mM) により脱分極された溶液中、 Ca^{2+} により誘発される大動脈の収縮に対しては影響を与えなかった (Fig. 27).

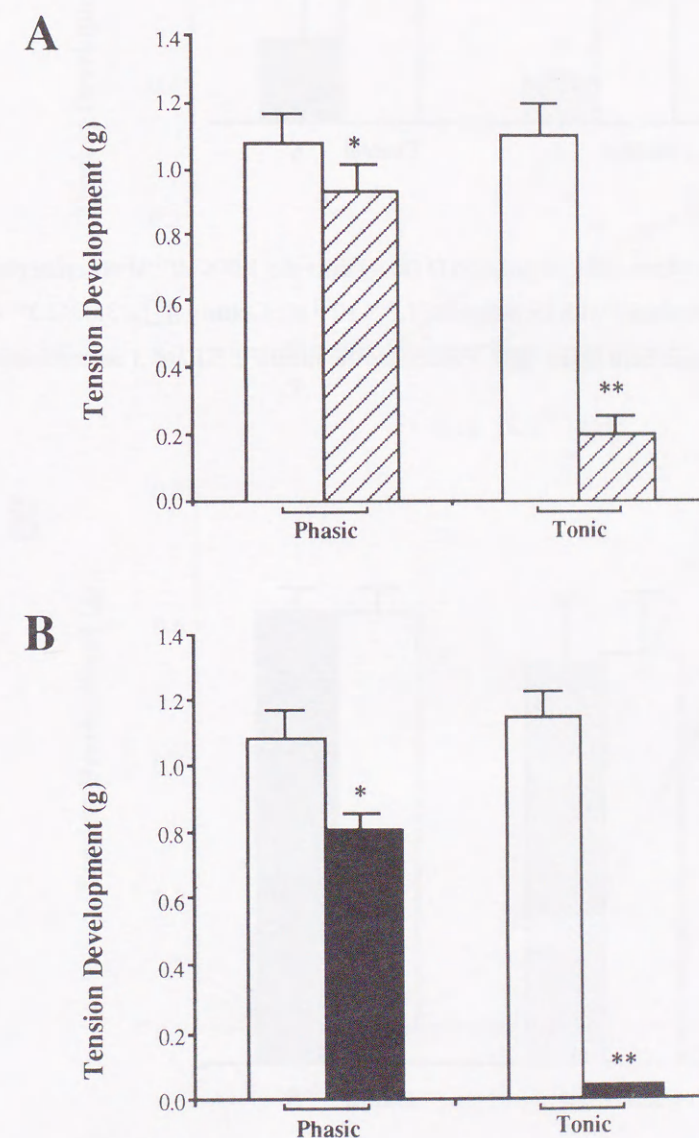


Fig. 23. Effects of fukinolic acid (4) (A) or cimicifugic acid D (6) (B) on 1.0×10^{-7} M norepinephrine-induced phasic and tonic contraction of rat aortic strips. Control (□); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (▨) (A); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (■) (B). Values are the means \pm S.E. of 3 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

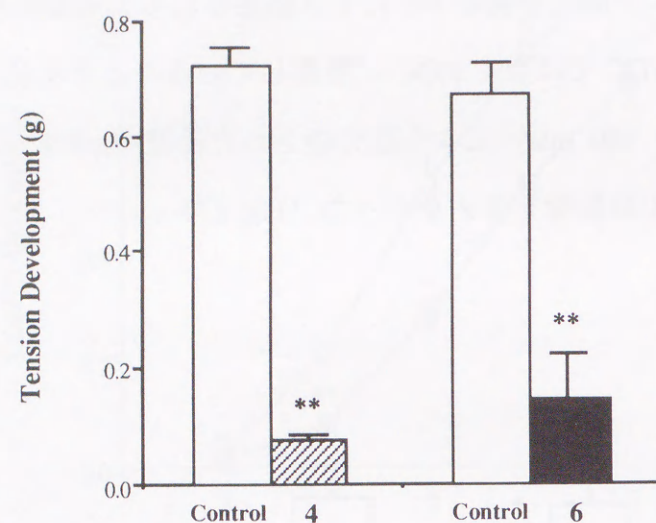


Fig. 24. Effects of fukinolic acid (4) or cimicifugic acid D (6) against the 1.0×10^{-7} M norepinephrine-induced contraction of rat aortic strips preincubated with nicardipine (1.0×10^{-6} M). Control (\square); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (hatched); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (\blacksquare). Values are the means \pm S.E. of 3 determinations. ** $p < 0.01$.

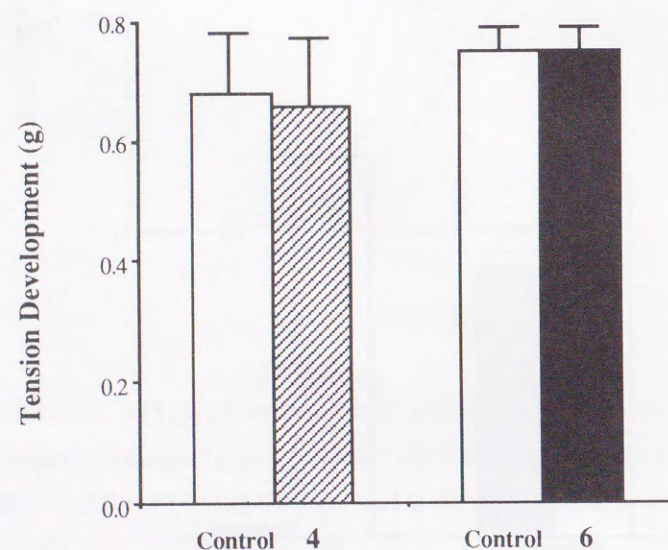


Fig. 25. High potassium (40 mM)-induced contraction of rat aortic strips preincubated with prazosin (1.0×10^{-6} M). Control (\square); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (hatched); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (\blacksquare). Values are the means \pm S.E. of 3 determinations.

第三項 Fukinolic acid および cimicifugic acid D の大動脈収縮抑制の作用機序

Phasic 相の血管収縮は、 α_1 -作動薬に応答して phosphatidylinositol の代謝回転により、細胞内 Ca^{2+} の流動化により活性化されることが報告されている⁴⁰⁾。また、NE

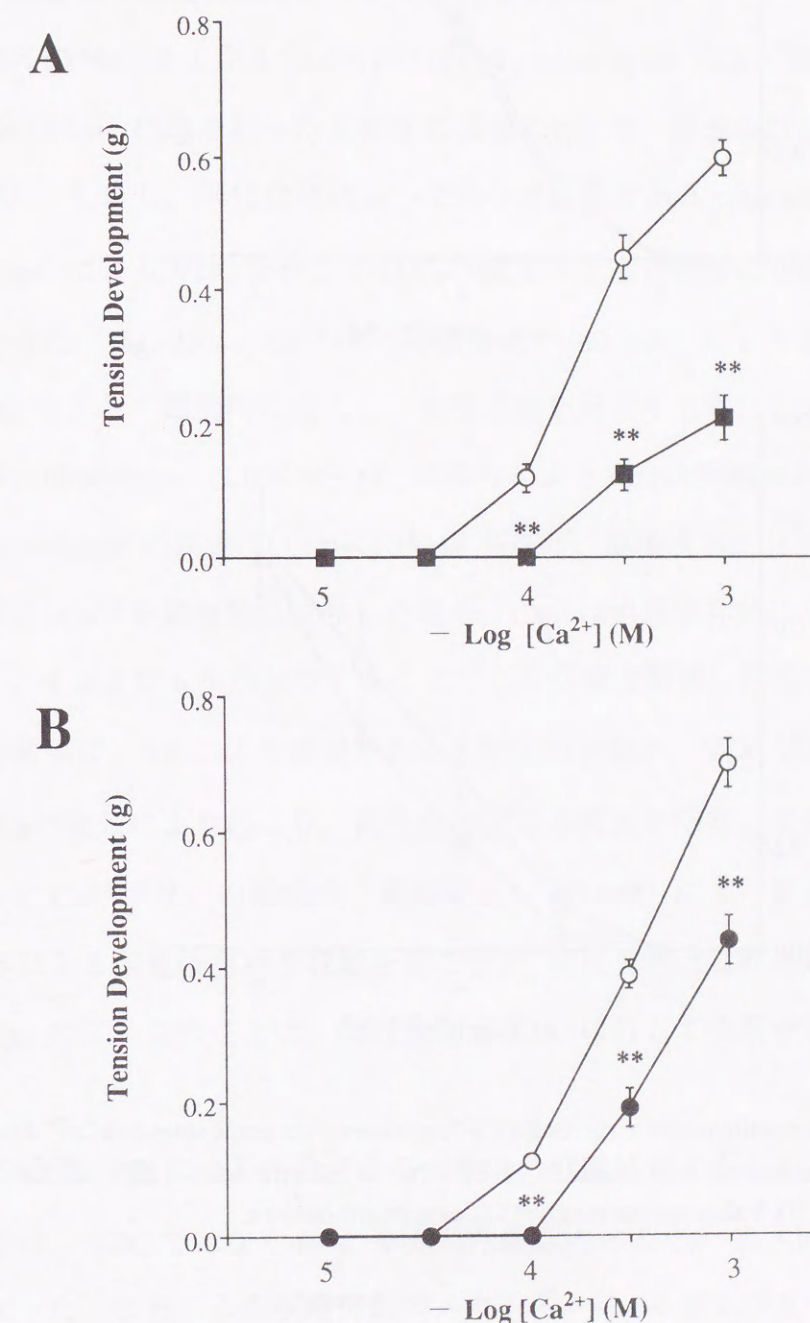


Fig. 26. Concentration contractile response curves for Ca^{2+} responses of rat aortic strips in a Ca^{2+} -free medium preincubated with norepinephrine (1.0×10^{-6} M) and nicardipine (1.0×10^{-6} M). Control (○); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (■) (A); 3.0×10^{-5} M cimicifugic acid D (6) (●) (B). Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. ** $p < 0.01$.

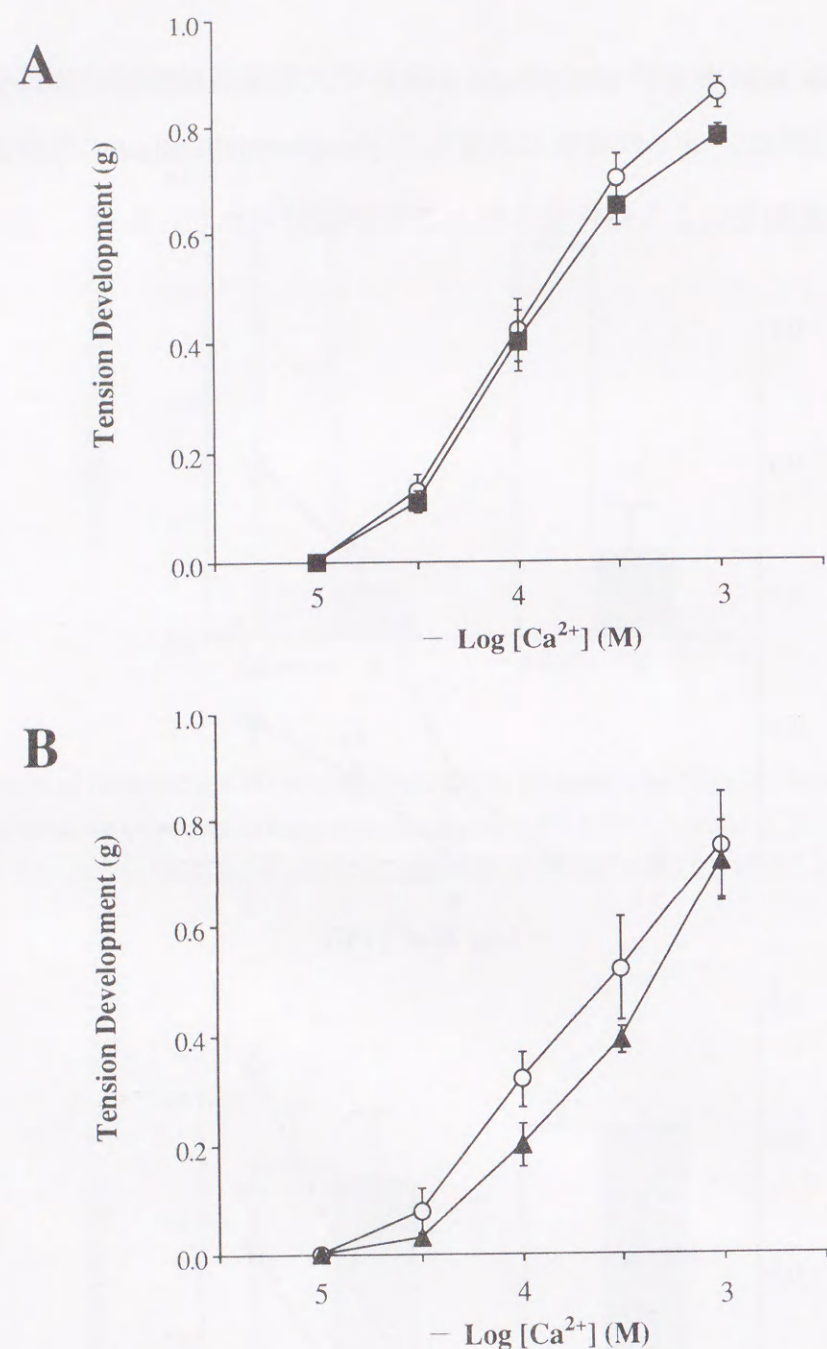


Fig. 27. Concentration contractile response curves for Ca^{2+} responses of rat aortic strips in a Ca^{2+} -free medium preincubated with high potassium (60 mM). Control (○); 3.0×10^{-4} M fukinolic acid (4) (■) (A); 3.0×10^{-4} M cimicifugic acid D (6) (▲) (B). Values are the means \pm S.E. of 4 determinations.

により誘発される大動脈の収縮は、phasic 相の収縮として筋小胞体から細胞内 Ca^{2+} が遊離されることに始まり⁴¹⁾，tonic 相における持続的な収縮は、VDC または ROC を介して、細胞外 Ca^{2+} の細胞内流入により惹起されると考えられる⁴²⁾。今回の実験

で、fukinolic acid (4) および cimicifugic acid D (6) は、NE (1.0×10^{-7} M) により誘発される大動脈の tonic 相の収縮を特異的に抑制したが、phasic 相での収縮抑制は軽微であった (Figs. 21–23)。そこで、両化合物が ROC あるいは VDC のいずれのチャンネルに影響して収縮抑制を示すかを検討した。

4 (3.0×10^{-4} M) および 6 (3.0×10^{-4} M) は、nicardipine (1.0×10^{-6} M) 高濃度存在下、NE (1.0×10^{-7} M) 処理を行った大動脈の収縮に対して、顕著な収縮抑制作用を示した (Fig. 24)。しかし、両化合物は α_1 -受容体遮断薬である prazosin の存在下、高濃度 K^+ (40 mM) による VDC を介しての Ca^{2+} 流入による大動脈の収縮に対しては影響を与えなかった (Fig. 25)。 Ca^{2+} は、高濃度 K^+ (60 mM) により脱分極された血管細胞の VDC を介して細胞内に流入し、血管収縮を起こすと考えられている。また、この収縮は、nicardipine (1.0×10^{-6} M) の投与により完全に抑制される。 Ca^{2+} フリーの溶液中 nicardipine の高濃度 (1.0×10^{-6} M) 存在下、高濃度 NE (1.0×10^{-6} M) で処理した大動脈に Ca^{2+} を累積的に投与した場合、 Ca^{2+} は用量依存的に大動脈の収縮を誘起させるが、4 および 6 を前投与することでこの収縮は顕著に抑制された (Fig. 26)。これらの結果は、NE により誘発される大動脈の収縮が、VDC 非感受性の ROC を介しての Ca^{2+} 流入により起こり、両化合物がこの流入を阻害している事を示唆している。さらに Ca^{2+} フリーの溶液中、高濃度 K^+ (60 mM) により脱分極された大動脈は、 Ca^{2+} 投与による用量依存的な収縮を起こすが、両化合物はこれに対し影響を与えなかった (Fig. 27)。このことは、両化合物が VDC に対して作用がないこと示唆している。

以上の結果、NE により誘発される大動脈の収縮に対する 4 および 6 の収縮抑制の作用機序は、VDC ではなく ROC を介した細胞内への Ca^{2+} 流入阻害であることが明らかとなった。なお、この収縮抑制のメカニズムは、4 および 6 の類似化合物である 8-*epi*-blechnic acid のそれと類似していると考えられる (Fig. 28)³⁹⁾。Escubedo らは、caffeic acid を NE と同時に投与した場合、NE の作用が抑制されることから、caffeic acid が α_1 -adrenergic receptor 上の部分アゴニスト (作動薬) であると報告している⁴³⁾。

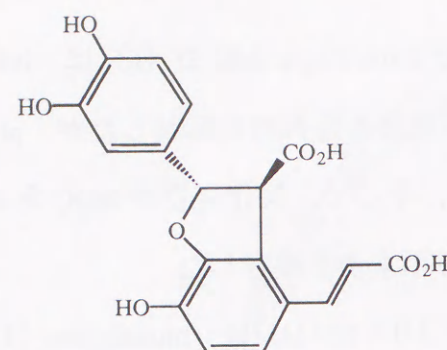


Fig. 28. Structure of 8-*epi*-blechnic acid.

このことは今回の実験においても, caffeic acid が 3.0×10^{-4} M の濃度において大動脈の収縮を起こすが, その収縮の用量反応曲線は NE ($1.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-7}$ M) の累積的投与によって影響を受けなかったことから確認された. 一方, 4 および 6 それ自身は, 大動脈に対して影響を与えずに, NE を加えた場合の tonic 相の収縮を選択的に抑制した. これらの結果より, 両化合物は caffeic acid を部分構造に持つが, 大動脈に対する作用のメカニズムは, caffeic acid のそれとは明らかに異なっていると考えられる.

第四項 Cimicifugic acid C の大動脈血管平滑筋に及ぼす作用

Cimicifugic acid C (3) は, $1.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ M の濃度で用量依存的に大動脈の収縮作用を示したが, NE のそれよりは高用量必要であった (Fig. 29).

第二節 構造活性相関

今回実験に供した cimicifugic acid A (1), B (2) および fukinolic acid (4) は, caffeic acid 類 (=caffeic acid, ferulic acid, isoferulic acid) と fukiic acid (5) の C-2 の水酸基とのエステルであり, cimicifugic acid D (6) と cimicifugic acid E (7) は, piscidic acid (9) とのエステルである. 一方, cimicifugic acid C (3) は, 5 と *p*-coumaric acid ($R_2 = H, R_3 = OH$) との C-2 の水酸基とのエステルである (Fig. 30).

今回のラット大動脈に対する作用には, fukiic acid または piscidic acid に結合する caffeic acid 部分がより重要な役割をはたしていると考えられる. すなわち, フェルロ

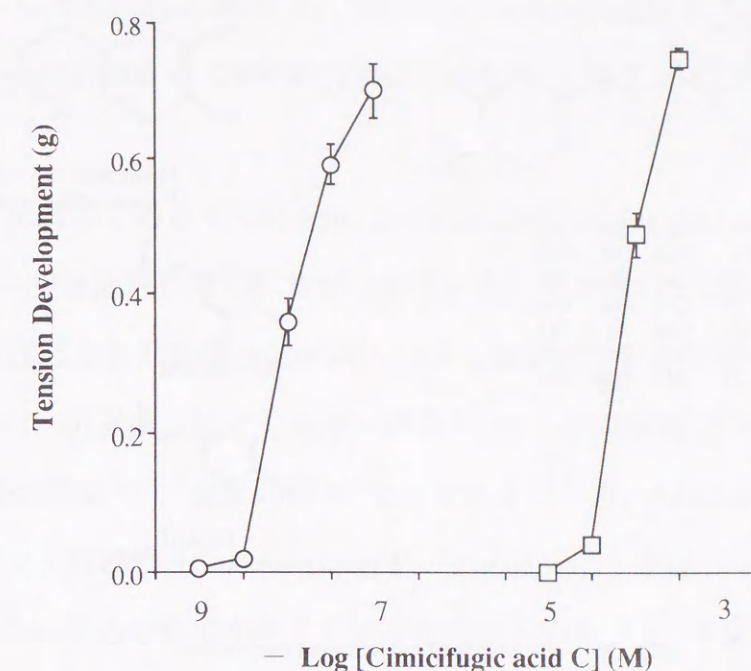


Fig. 29. Concentration response curves for cimicifugic acid C (3) ($1.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ M)-induced (□) and norepinephrine-induced (○) contraction of rat aortic strips.

イル基 (1 と 7) およびイソフェルロイル基 (2) は作用発現に影響を与えず, カフェオイル基 (4 と 6: $R_2 = OH, R_3 = OH$) は収縮抑制作用に, パラクマロイル基 (3: $R_2 = H, R_3 = OH$) は収縮作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった. 一方, C-2 の水酸基がエステル結合していない, すなわち水酸基フリーである fukiic acid (5) 自身には大動脈に対する作用は認められなかった. 大動脈に対して, 収縮抑制と収縮の背反する作用を持つ 2 系統の化合物が, 升麻中に共存する成分として見いだされたことは, きわめて興味深いことである.

第三節 小結

Fukinolic acid (4) および cimicifugic acid D (6) は, 各々 3.0×10^{-4} M の濃度において, ラット摘出大動脈標本の NE により誘発される収縮に対して持続性の収縮抑制作用を示し, その抑制作用は phasic 相よりも tonic 相でより顕著に認められた. また,

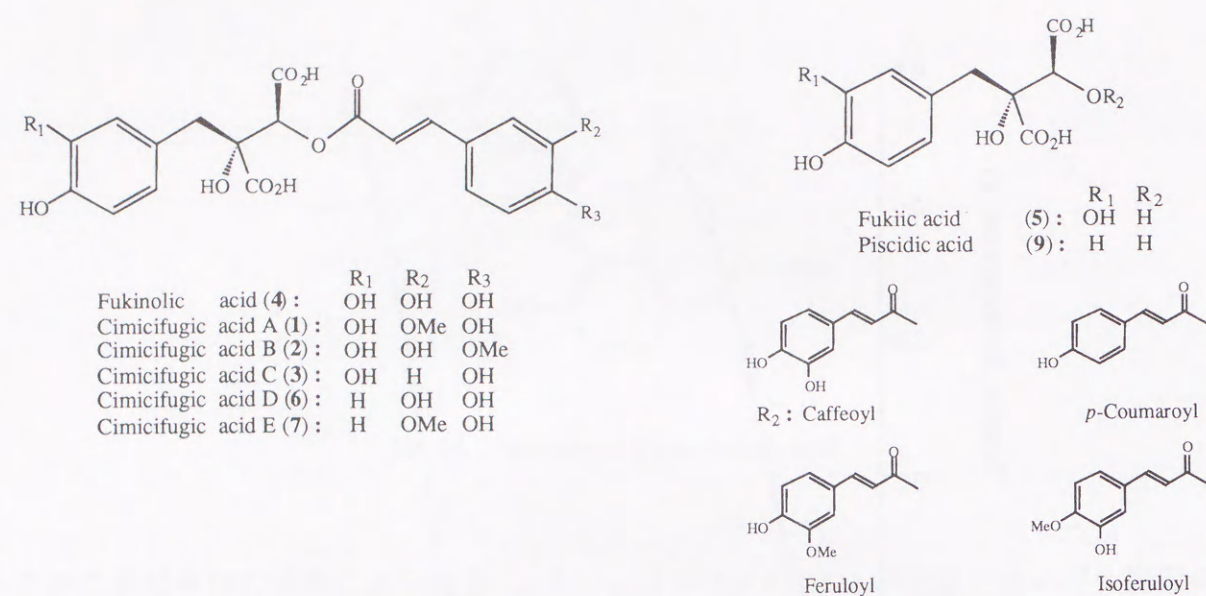


Fig. 30. Structures of caffeic acid derivatives.

この作用は caffeic acid の大動脈に対する作用とは明らかに異なっており、その作用機序は、VDC の阻害によるものではなく、ROC を介しての細胞内への Ca²⁺ の流入阻害によるものであると考えられる。

一方、cimicifugic acid C (3) は $1.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ M の濃度において用量依存的な大動脈の収縮作用を示した。また、4 および 6 の関連化合物は、大動脈に対し fukiic acid または piscidic acid とエステル結合するカフェオイル基が収縮抑制作用に、そしてパラクマロイル基が収縮作用にそれぞれ寄与していると考えられる。

第六章 Cimicifugic acid A, fukinolic acid の発芽抑制作用および α -amylase と carboxypeptidase A に対する阻害活性

Caffeic acid 誘導体である ferulic acid, isoferulic acid, chlorogenic acid, rosmarinic acid などには多くの生物活性作用の報告がされている。すなわち、補体の活性阻害⁴⁴⁾、adenine により誘起された腎臓 angiotensin による血圧に対する作用⁴⁵⁾、抗菌作用⁴⁶⁾、抗 HIV 活性⁴⁷⁾、抗炎症・抗アレルギー作用^{17, 48)}、抗変異原性⁴⁹⁾、抗酸化作用、interleukin-8 産生抑制¹⁷⁾、発芽抑制⁵⁰⁾ などである。一方、fukiic acid (5) と piscidic acid (9) は、マメ科植物 [*Cajanus cajan* L. (pigeonpea)] が低リン (P) 土壌からリン酸を植物体内に取込む作用があることで知られている²⁶⁾。本章では、サラシナシヨウマ地下部から得られた cimicifugic acid A および fukinolic acid の4種の植物種子に対する発芽抑制作用、さらに両化合物の α -amylase と carboxypeptidase A に対する阻害活性について詳述する。

第一節 発芽抑制作用

シソ科植物に広く分布する rosmarinic acid と共に、今回得られた cimicifugic acid A (1)、fukinolic acid (4) および caffeic acid (10) の有する発芽抑制 (= 発根阻害) 作用を、4 種の植物種子すなわち *Sesamum indicum* L. (ゴマ: ゴマ科 Pedaliaceae)、*Brassica rapa* L. var *akana* (アカナ: アブラナ科 Cruciferae)、*Allium tuberosum* (ニラ: ユリ科 Liliaceae) および *Echinochloa utilis* (ヒエ: イネ科 Poaceae) に対してそれぞれ検討した (Fig. 31)。その結果、1、4 および rosmarinic acid にはこれら 4 種の植物種子に対し $1.0 \times 10^{-4} - 3.0 \times 10^{-4}$ M の濃度において顕著な発芽抑制作用が認められた。特に、*Echinochloa utilis* の発芽は、rosmarinic acid、1 および 4 の各々 3.0×10^{-4} M の濃度ではほぼ完全に抑制された。しかし、10 の発芽抑制作用発現には前 3 種の化合物より高用量必要であった。また 1 と rosmarinic acid は、各々 1.0×10^{-4} M および 3.0×10^{-4} M の濃度で *Sesamum indicum* に対して顕著な発芽抑制作用を示したが、10 と 4 のそれは前 2

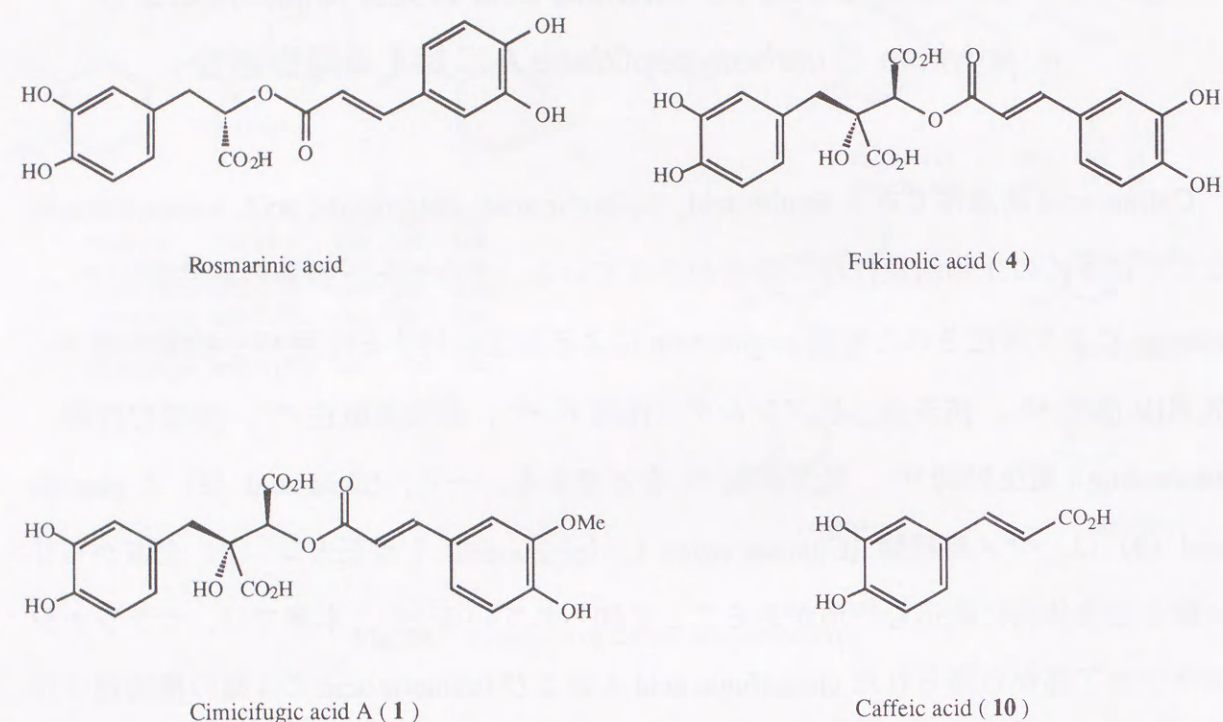


Fig. 31. Structures of caffeic acid derivatives.

Table 6 (1). The Plant Growth-Inhibitory Activity of Fukinolic Acid (4), Cimicifugic Acid A (1) and Rosmarinic Acid

Plant	Root Growth (mm) ^{a)}						
	Rosmarinic acid		4		1		Control
	Concentration (M)	3.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁴	
[Dicotyledoneae]							
<i>Sesamum indicum</i> L.	6.6±2.5	27.4±2.7	12.3±3.5	26.2±3.4	3.1±3.9	25.9±6.5	39.0±6.0
<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>akana</i> Kitam.	6.4±4.1	20.6±6.6	35.5±4.8	48.7±5.0	45.4±12.3	43.8±6.3	52.0±7.4
[Monocotyledoneae]							
<i>Allium tuberosum</i> Rottl.	3.1±0.8	5.9±1.7	2.8±0.4	6.1±0.9	3.0±1.1	4.4±1.0	7.1±0.7
<i>Echinochloa utilis</i> Ohwi et Yabuno	—	4.4±0.4	<0.5	5.4±0.5	<0.5	2.8±0.7	23.4±3.4

a) Each value is the mean ± S.D.; observation time, 7th day (*A. tuberosum*: 10th day) at 27.0 ± 0.5°C; quantity of light, 9000 cd/m². sr; illumination time, 12 h/d; experimental size, 20 seeds/groups.

Table 6 (2). The Plant Growth-Inhibitory Activity of Caffeic Acid (10)

Plant	Root Growth (mm)				
	10		2,4-D ^{a)}		Control
	Concentration (M)	3.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁴	
[Dicotyledoneae]					
<i>Sesamum indicum</i> L.	26.0±3.1	28.6±2.5	— ^{b)}	—	39.0±6.0
<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>akana</i> Kitam.	70.0±19.5	60.5±8.1	2.1±0.3	2.6±0.4	52.0±7.4
[Monocotyledoneae]					
<i>Allium tuberosum</i> Rottl.	3.5±2.5	2.1±2.3	—	—	7.1±0.7
<i>Echinochloa utilis</i> Ohwi et Yabuno	2.4±0.3	8.5±2.2	—	1.1±0.3	23.4±3.4

a) Sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate.

b) No germination.

種の化合物よりもより弱い抑制作用であった [Tables 6 (1)および 6 (2)].

これらの結果より, caffeic acid の発芽抑制作用は, 1, 4 および rosmarinic acid のように caffeic acid が fukiic acid (5) によりエステル化されることで, その作用が増強されていることを示している. 植物種子に対する発芽抑制作用は, caffeic acid 誘導体である cinnamic acid (桂皮酸), ferulic acid, chlorogenic acid, 3-caffeoylquinic acid などでも報告されている⁵⁰⁾. この作用のメカニズムは明確ではないが, cinnamic acid の植物成長阻害活性が RNA 生成阻害によると報告されており⁵¹⁾, 示唆に富んでいる.

第二節 α-Amylase および carboxypeptidase A に対する阻害活性

第一節の 4 種の caffeic acid 誘導体について, α-amylase と carboxypeptidase A に対する阻害作用を検討した⁵²⁻⁵⁴⁾. これらのうち, α-amylase に対する阻害作用は cimicifugic acid A (1) の 50% 増殖阻止濃度 (以下, IC₅₀ 値と略) が 2.4×10⁻⁵ M で最も強く, fukinolic acid (4), caffeic acid (10) および rosmarinic acid がそれに続く阻害作用を示した. 1 と 4 の両酵素に対する阻害作用は, 対照の acarbose よりも強く,

Table 7. Inhibitory Activity of Fukinolic Acid (4), Cimicifugic Acid A (1), Rosmarinic Acid and Caffeic Acid (10) on α -Amylase

Compound	Concentration (M)	Inhibition (%) ^{a)}	IC ₅₀ (M)
4	1.0×10^{-3}	92.7	4.0×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	87.8	
	1.0×10^{-4}	74.0	
	5.0×10^{-5}	61.9	
	1.0×10^{-5}	0.6	
1	1.0×10^{-3}	96.2	2.4×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	89.3	
	1.0×10^{-4}	86.1	
	5.0×10^{-5}	79.5	
	1.0×10^{-5}	3.7	
Rosmarinic acid	1.0×10^{-3}	80.0	1.0×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	71.3	
	1.0×10^{-4}	49.8	
	5.0×10^{-5}	14.5	
10	1.0×10^{-3}	91.4	9.7×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	74.9	
	1.0×10^{-4}	56.1	
	5.0×10^{-5}	17.5	
[Control] Acarbose	1.0×10^{-3}	88.5	9.2×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	66.7	
	1.0×10^{-4}	51.4	
	5.0×10^{-5}	37.1	

a) In standard assay at pH 5.0 mean for duplicate assays on each sample.

発芽抑制作用と同様に, fukiic acid (5) のエステル誘導体として caffeic acid 単体よりその阻害活性が強められていた (Table 7). 一方, 1 と 4 の carboxypeptidase A に対する阻害活性は, IC₅₀ 値が 各々 2.0×10^{-4} M および 1.7×10^{-4} M であり, 両化合物とも対照とした 1,10-phenanthroline の IC₅₀ 値 4.2×10^{-4} M より強い阻害活性を示した. また, rosmarinic acid の阻害活性は弱く, 10 には同活性が認められなかった (Table 8).

α -Amylase に対する阻害作用は, 検討した caffeic acid およびその誘導体に共通する生物活性であると言える. また, α -amylase は発芽の初期の段階で, 貯蔵デンプンを glucose に加水分解する酵素とされる⁵⁵⁾. Carboxypeptidase A は, 発芽の初期の段階における mRNA 合成に関与するペプチドの合成を促し⁵⁶⁾, α -amylase と共に発芽に重要な関連がある. 1 と 4 は, caffeic acid (10) 関連化合物であるが, fukiic acid 関

連化合物でもある. Caffeic acid 関連化合物の生物活性は数多く報告されており, 特に抗酸化性と関連する活性が数多く研究されている. しかし, fukiic acid 関連化合物についてのこれらの生物活性についてはほとんど報告されていない.

Table 8. Inhibitory Activity of Fukinolic Acid (4), Cimicifugic Acid A (1), Rosmarinic Acid and Caffeic Acid (10) on Carboxypeptidase A

Compound	Concentration (M)	Inhibition (%) ^{a)}	IC ₅₀ (M)
4	1.0×10^{-3}	89.3	1.7×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	76.3	
	1.0×10^{-4}	38.1	
1	1.0×10^{-3}	85.0	2.0×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	74.5	
	1.0×10^{-4}	31.7	
Rosmarinic acid	1.0×10^{-3}	67.0	8.2×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	3.1	
	1.0×10^{-4}	0.0	
10	1.0×10^{-3}	18.6	— ^{b)}
[Control] 1,10-Phenanthroline	1.0×10^{-3}	73.1	4.2×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	57.5	
	1.0×10^{-4}	12.8	

a) In standard assay at pH 5.0 mean for duplicate assays on each sample.

b) Not calculated.

第三節 小結

1 および 4 は, 4 種の植物種子に対して顕著な発芽抑制作用を示した. また, 両化合物は α -amylase および carboxypeptidase A に対しても強い阻害活性を示し, α -amylase に対しては, 1 > 4 > acarbose \approx 10 \approx rosmarinic acid であり, carboxypeptidase A に対しては, 1 \approx 4 > 1, 10 - phenanthroline > rosmarinic acid > 10 であった. また, これらの活性には caffeic acid にエステル結合する fukiic acid 部分が関与していると思われる. 本研究は, fukiic acid をリード化合物として生物活性物質を検索する上での最初のものになると考えられる.

第七章 サラシナショウマ属植物から得られるトリテルペノイドの 抗マラリア原虫活性とヌクレオシド取り込み阻害活性

Cimicifuga 属植物から得られたトリテルペノイド化合物 (第二章) およびその関連誘導体の 59 検体について, 抗マラリア原虫活性を評価した. その結果, 25 検体に抗マラリア原虫活性が認められ, そのうち 17 検体は共通の 16:23;23:26;24:25-triepoxy 側鎖構造を有する化合物であった (第一節). また, これらのうち 9 検体については細胞内への強いヌクレオシド取り込み阻害を示した (第二節). また, 最終節ではこれらの関係を論述する.

第一節 抗マラリア原虫活性

第一項 抗マラリア原虫活性

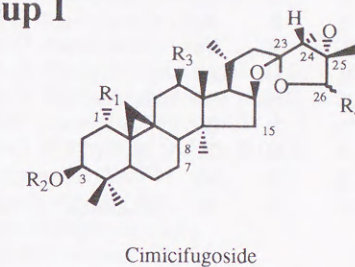
抗マラリア原虫活性は, 前培養した熱帯性マラリア原虫 FCR-3 株を用い, 対照化合物に quinine, chloroquine および pyrimethamine を用いた. 一方, 化合物の細胞毒性の指標としてマウス乳癌由来の FM3A 細胞に対する 50% 阻止濃度 (以下, EC_{50} 値と略) を求め, 抗マラリア原虫活性と比較した. 59 検体 (27-85) のトリテルペノイドは, その化学構造から 5 つのグループ (group I~V) に区分することができるが [Figs. 32 (1) および 32 (2)], ほとんどの検体に最終濃度 $0.6-56.0 \mu M$ で抗マラリア原虫活性が認められた (Table 9). これらのうち, 特に cimicifugoside (27) 関連化合物である 28-45 を含む 25 検体の EC_{50} 値は $1.0-13.0 \mu M$ で, コントロールの EC_{50} 値は quinine = $110.0 nM$, chloroquine = $18.0 nM$ および pyrimethamine = $1.0 nM$ であった (Tables 9 および 10).

第二項 構造活性相関

抗マラリア原虫活性とトリテルペノイドの構造活性相関を Fig. 33 にまとめた. 活性の強い 25 検体の化合物のうち, 19 検体 27-45 が共通の 16:23;23:26;24:25-triepoxy 側鎖構造を有する group I に, 4 検体 62, 70, 72, 75 が group IV に, そして 2 検体 46,

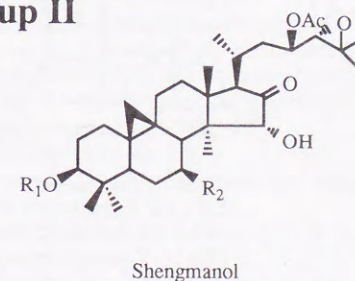
48 が group II に属している. 一方, group V には強い活性を示す化合物が見い出されなかった. また, FM3A に対する細胞毒性は 27, 28, 30, 36, 40, 43, 46 および 48 で EC_{50} 値 $>9.2 \mu M$ であった. このことは, cimicifugoside (27) が L-5178, cl D 細胞など細胞成長に対して $7.5 \mu M$ の濃度で影響を与えないという実験結果 (16-b) から

Group I



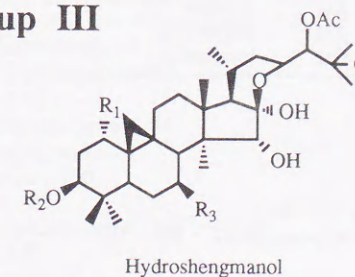
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	C-7, 8
27 :	H	Xyl	OAc	OH	△
28 :	H	Xyl	OAc	OH	
29 :	OH	Xyl	H	OH	△
30 :	OH	Xyl	H	OH	
31 :	H	Xyl	OAc	α -OMe	△
32 :	H	Xyl	OAc	β -OMe	△
33 :	H	Xyl	OAc	α -OMe	
34 :	H	Xyl	OAc	β -OMe	
35 :	OH	Xyl	H	α -OMe	△
36 :	OH	Xyl	H	β -OMe	△
37 :	OH	Xyl	H	α -OMe	
38 :	OH	Xyl	H	β -OMe	
39 :	O	Xyl	H	OH	
40 :	O	Xyl	H	OH	△
41 :	H	Xyl	OAc	H	△
42 :	H	Xyl	OAc	O	
43 :	H	H	OAc	OH	
44 :	OH	H	H	OH	△
45 :	OH	H	H	OH	

Group II



	R ₁	R ₂	C-7, 8
46 :	Xyl-Glc	H	
47 :	Xyl	H	
48 :	Xyl	OH	
49 :	Ara	H	△
50 :	H	H	
51 :	H	OH	

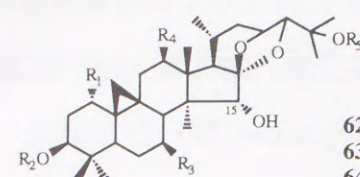
Group III



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	C-7, 8
52 :	H	Xyl	H	H	
53 :	H	Xyl	H	Me	
54 :	H	Xyl	OH	Me	
55 :	OH	Xyl	Me	Me	
56 :	H	Gal	H	H	△
57 :	H	H	H	H	
58 :	H	H	H	Me	
59 :	H	H	OH	Me	
60 :	OH	H	H	Me	
61 :	H	H	H	H	△

Fig. 32 (1). Structures of triterpene compounds 27-61.

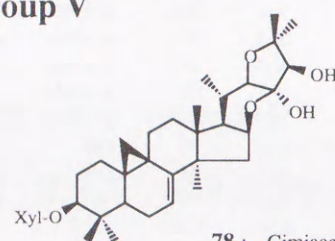
Group IV



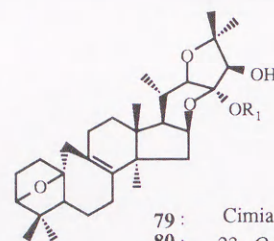
Cimigenol

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	C-7, 8
62 :	H	Xyl-Glc	H	H	Ac	
63 :	H	Xyl	H	H	Ac	
64 :	OH	Xyl	H	H	Ac	
65 :	H	Ara	H	OH	H	
66 :	H	Xyl	OH	H	H	
67 :	OH	Xyl	H	H	H	
68 :	H	Xyl	OH	H	Ac	
69 :	H	Gal	H	H	H	△
70 :	H	H	H	H	Ac	
71 :	H	H	OH	H	Ac	
72 :	OH	H	H	H	Ac	
73 :	H	H	H	OH	H	
74 :	H	H	OH	H	H	
75 :	H	H	H	H	H	
76 :	H	H	H	H	Me	
77 :	H	H	H	H	H	15-Deoxy

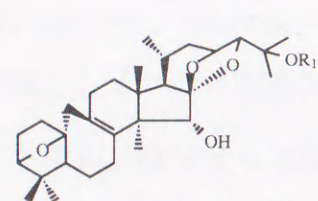
Group V



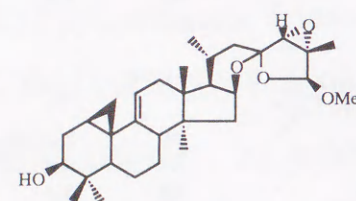
78 : Cimiaceroside



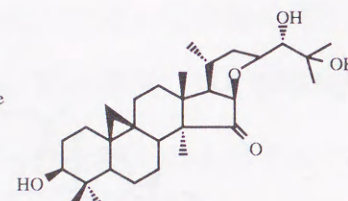
79 : Cimiacerol (R₁=H)
80 : 23-O-Methylcimiacerol (R₁=Me)



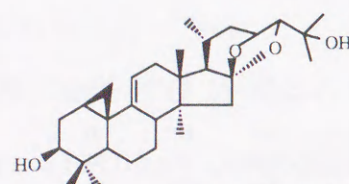
81 : Acerinol (R₁=H)
82 : Acerinol acetate (R₁=Ac)



83 : 26-O-Methylcimicimol



84 : Isodahurinol



85 : Simplexol

Xyl-Glc :	xylosyl-glucoside
Xyl :	xyloside
Ara :	arabioside
Gal :	galactoside

Fig. 32 (2). Structures of triterpenic compounds 62–85.

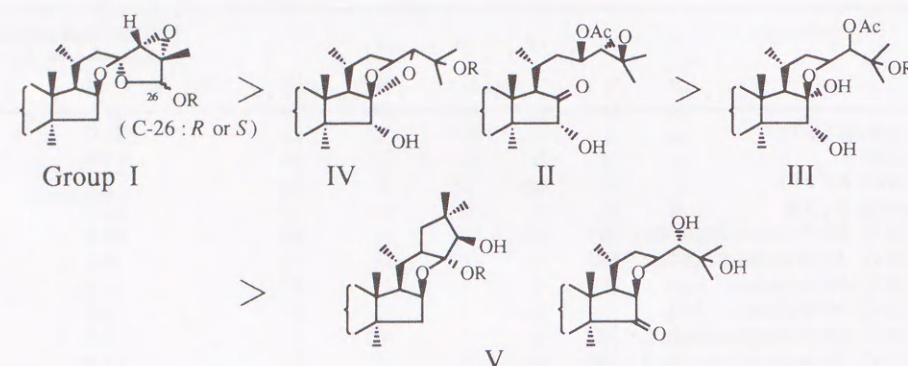
支持された。しかし、FM3A 細胞に対する細胞毒性と抗マラリア原虫活性との選択毒性指数は、1–6 とそれほど高くなかった (Table 10)。

Table 9. Growth-Inhibitory Activity of Triterpenoids and Their Derivatives from *Cimicifuga* spp. on Malaria Parasites (*Plasmodium Falciparum*)

Compound	<i>Plasmodium falciparum</i>	
	fc, ^{a)} μM	Growth %
Cimicifugoside (27)	36.0	6.0
Actein (28)	15.0	78.6
Bugbanoside A (29)	3.0	42.3
Bugbanoside B (30)	12.0	63.7
(26S)-26-O-Methylcimicifugoside (31)	20.0	0.0
(26R)-26-O-Methylcimicifugoside (32)	6.9	28.6
(26S)-26-O-Methylactein (33)	1.4	53.0
(26R)-26-O-Methylactein (34)	3.3	13.7
(26S)-26-O-Methylbugbanoside A (35)	5.3	48.7
(26R)-26-O-Methylbugbanoside A (36)	11.0	6.0
(26S)-26-O-Methylbugbanoside B (37)	2.9	44.4
(26R)-26-O-Methylbugbanoside B (38)	2.7	80.0
1-Ketobugbanoside A (39)	6.4	50.3
1-Ketobugbanoside B (40)	4.6	88.6
26-Deoxycimicifugoside (41)	3.0	48.7
Cimicifugoside lactone (42)	6.7	0.0
Cimicifugenin (43)	20.0	9.4
Bugbanogenin A (44)	8.2	44.4
Bugbanogenin B (45)	8.6	40.2
23-O-Acetylshengmanol xylosyl-glucoside (=Xyl-Glc) (46)	11.0	0.0
23-O-Acetylshengmanol xyloside (=Xyl) (47)	56.0	37.0
7β-Hydroxy-23-O-acetylshengmanol Xyl (48)	27.0	0.0
23-O-Acetyl-7,8-didehydroshengmanol arabinoside (=Ara) (49)	10.0	31.6
23-O-Acetylshengmanol (50)	14.0	18.8
7β-Hydroxy-23-O-acetylshengmanol (51)	4.0	61.5
24-O-Acetylhydroshengmanol Xyl (52)	5.6	65.8
24-O-Acetyl-25-O-methylhydroshengmanol Xyl (53)	23.0	82.9
7β-Hydroxy-24-O-acetyl-25-O-methylhydroshengmanol Xyl (54)	36.0	61.5
1α-Hydroxy-24-O-acetyl-25-O-methylhydroshengmanol Xyl (55)	3.9	53.0
24-O-Acetyl-7,8-didehydroshengmanol galactoside (=Gal) (56)	13.0	97.9
24-O-Acetylhydroshengmanol (57)	12.0	35.5
24-O-Acetyl-25-O-methylhydroshengmanol (58)	42.0	44.4
7β-Hydroxy-24-O-acetyl-25-O-methylhydroshengmanol (59)	2.1	57.3
1α-Hydroxy-24-O-acetyl-25-O-methylhydroshengmanol (60)	3.1	74.4
24-O-Acetyl-7,8-didehydroshengmanol (61)	27.0	40.2
25-O-Acetylcimigenol Xyl-Glc (62)	43.2	0.0
25-O-Acetylcimigenol Xyl (63)	16.0	74.4
1α-Hydroxy-25-O-acetylcimigenol Xyl (64)	27.0	50.9
12β-Hydroxycimigenol Ara (65)	42.0	76.5
7β-Hydroxycimigenol Xyl (66)	19.3	78.6
1α-Hydroxycimigenol Xyl (67)	36.1	53.0
7β-Hydroxy-25-O-acetylcimigenol Xyl (68)	13.2	57.3
Cimigenol Gal (69)	6.2	72.2
25-O-Acetylcimigenol (70)	6.4	9.2
7β-Hydroxy-25-O-acetylcimigenol (71)	9.2	44.4
1α-Hydroxy-25-O-acetylcimigenol (72)	45.3	4.3
12β-Hydroxycimigenol (73)	36.1	40.2
7β-Hydroxycimigenol (74)	25.2	35.9
Cimigenol (75)	24.1	14.5
25-O-Methylcimigenol (76)	24.2	66.9
15-Deoxycimigenol (77)	5.3	62.9
Cimiaceroside (78)	8.4	78.6
Cimiacerol (79)	9.8	70.9
23-O-Methylcimiacerol (80)	33.1	78.9
Acerinol (81)	0.6	85.7
Acerinol acetate (82)	6.3	81.7
26-O-Methylcimicimol (83)	1.5	49.1
Isodahurinol (84)	15.1	94.9
Simplexol (85)	8.3	100.0
Quinine	0.1	50.0

a) fc : final compound concentration.

(1) Side chains



(2) A, B ring

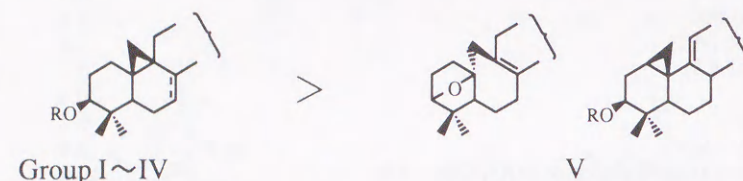


Fig. 33. Relationships between functional groups and antimalarial activity.

第二節 ヌクレオシド取り込み阻害活性

19 検体のトリテルペノイドについて, concanavalin A (Con A) で刺激したマウス脾細胞を用いてトリチウムラベルした thymidine (^3H -TdR) の取り込みについて検討した. その結果, group I に属する 9 検体 **27**, **29**–**34**, **36** および **38** に強い取り込み阻害活性が見い出され, その IC_{50} 値は 17.8 nM – $1.7 \mu\text{M}$ (12 – 1050 ng/ml) であった (Table 11). しかし, 化合物 **35** および **37**, さらに group II–V に属する **47**, **48**, **61**, **63**–**66** および **78** の取り込み阻害活性は弱いものであった. これらの結果は, **27** が phytohemagglutinin (PHA) で刺激した人リンパ球への ^3H -TdR 取り込みを強力に阻害する (IC_{50} 値 4.0 – 5.0 ng/ml)^{16a)} とした結果と対応し, また側鎖に 16:23;23:26;24:25-triepoxyl 構造を有することが活性発現に必要であることが考えられる. また, 興味深いことに, 26R 配位を有する **32**, **34**, **36** および **38** の取り込み阻害活性は, 26S 配位の **31**, **33**, **35** および **37** のそれに比べて 3–18 倍強かった (Table 11). 一方, camicifugoside (**27**) によるマウスおよびヒトのリンパ球への ^3H -TdR および

Table 10. Antimalarial Activity and Cytotoxicity of Triterpenoids and Their Derivatives from *Cimicifuga* spp.

Compound	Antimalarial activity (EC_{50}) ^{a)}	Cytotoxicity (EC_{50}) ^{b)}	Selective toxicity
	μM	μM (Cell growth %) ^{c)}	Index ^{d)}
Cimicifugoside (27)	5.0	30.0 (50)	6
Actein (28)	10.0	>10.0 (91)	>1
Bugbanoside A (29)	2.6	> 3.0 (97)	>1
Bugbanoside B (30)	10.0	>12.0 (100)	>2
(26S)-26-O-Methylcimicifugoside (31)	1.3	2.2 (50)	2
(26R)-26-O-Methylcimicifugoside (32)	3.0	4.5 (86)	2
(26S)-26-O-Methylactein (33)	1.0	> 1.4 (87)	>1
(26R)-26-O-Methylactein (34)	1.8	3.3 (50)	2
(26S)-26-O-Methylbugbanoside A (35)	5.0	> 5.3 (96)	>1
(26R)-26-O-Methylbugbanoside A (36)	6.0	>11.0 (81)	>2
(26S)-26-O-Methylbugbanoside B (37)	3.0	> 2.9 (86)	>1
(26R)-26-O-Methylbugbanoside B (38)	9.0	> 2.7 (100)	-
1-Ketobugbanoside A (39)	6.4	> 6.4 (89)	>1
1-Ketobugbanoside B (40)	9.2	> 9.2 (68)	>1
26-Deoxycimicifugoside (41)	3.1	> 3.0 (100)	>1
Cimicifugoside lactone (42)	2.1	> 6.7 (68)	>3
Cimicifugenin (43)	13.0	15.0 (50)	1
Bugbanogenin A (44)	8.0	-	-
Bugbanogenin B (45)	8.2	-	-
23-O-Acetylshengmanol xylosyl-glucoside (46)	4.7	>11.0 (100)	>2
7 β -Hydroxy-23-O-acetylshengmanol xyloside (48)	12.0	>27.0 (96)	>2
25-O-Acetylcimigenol xylosyl-glucoside (62)	13.0	11.0 (50)	1
25-O-Acetylcimigenol (70)	1.7	1.5 (50)	1
1 α -Hydroxy-25-O-acetylcimigenol (72)	13.0	22.0 (50)	2
Cimigenol (75)	8.0	5.0 (50)	1
Quinine	0.11	50.0 (50)	450
Chloroquine	0.018	32.0 (50)	1780
Pyrimethamine	0.001	0.12 (50)	120

a) *Plasmodium falciparum* [FCR-3 (ATCC30932)].

b) Mouse mammary tumor cells (FM3A).

c) FM3A cell growth % at final compound concentration.

d) EC_{50} for FM3A cells / EC_{50} for *Plasmodium falciparum* (FCR-3).

uridine (^3H -UdR) の取り込み阻害活性について検討した. **27** は, Con A で刺激したマウス脾細胞 (mouse splenocyte) および PHA で刺激したヒト末梢血リンパ球 (human peripheral lymphocyte) への ^3H -TdR および ^3H -UdR の取り込みを共に強く阻害した. さらに, **27** は lipopolysaccharide (LSP) および PHA で刺激したマウスリンパ球への ^3H -TdR の取り込みを用量依存的に阻害した (Table 12 および Fig. 34).

第三節 ヌクレオシド取り込み阻害と抗マラリア原虫活性の関係

検討したトリテルペノイド 59 検体のほぼすべてに抗マラリア原虫活性が認められ, そのうち比較的活性の高いものは, 25 検体 **27**–**46**, **48**, **62**, **70**, **72** および **75** であ

Table 11. IC_{50} (ng/ml) of Triterpenoids and Their Derivatives from *CinCIFuga* spp. on Con A-Stimulated Lymphocyte Proliferation

Cimicifugoside (27)	12
Bugbanoside A (29)	1050
Bugbanoside B (30)	750
(26S)-26-O-Methylcimicifugoside (31)	210
(26R)-26-O-Methylcimicifugoside (32)	25
(26S)-26-O-Methylactein (33)	55
(26R)-26-O-Methylactein (34)	22
(26S)-26-O-Methylbugbanoside A (35)	7800
(26R)-26-O-Methylbugbanoside A (36)	660
(26S)-26-O-Methylbugbanoside B (37)	7700
(26R)-26-O-Methylbugbanoside B (38)	440
23-O-Acetylshengmanol xyloside (=Xyl) (47)	10000
7 β -Hydroxy-23-O-acetylshengmanol Xyl (48)	> 10000
24-O-Acetyl-7,8-didehydroshengmanol (61)	10000
25-O-Acetylcimigenol Xyl (63)	9900
1 α -Hydroxy-25-O-acetylcimigenol Xyl (64)	10000
12 β -Hydroxycimigenol arabinoside (65)	9500
7 β -Hydroxycimigenol Xyl (66)	8500
Cimiaceroside (78)	> 10000

Mouse splenocytes (5×10^5 cells/well) stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$). After incubation for 54 h, ^3H -TdR was added. Cells were harvested after further incubation for 18 h.

Table 12. Effects of Cimicifugoside (27) on Mitogen-Induced Proliferation of Different Cell Lines

Concentration (ng/ml)	% Inhibition	
	Human PBL ^{a)}	Mouse-splenocyte ^{b)}
2000.0	97.7	92.5
200.0	92.2	87.9
20.0	69.4	63.1
2.0	54.2	39.6
0.2	35.8	25.0

% Inhibition is expressed as a relative percentage of inhibition with dried free controls incubated under the same conditions.

^{a)} Human PBL (2×10^5 cells/well) stimulated with PHA (1%). After incubation for 54 h, ^3H -TdR was added. Cells were harvested after further incubation for 18 h.

^{b)} Mouse splenocytes (5×10^5 cells/well) stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$). After incubation for 54 h, ^3H -TdR was added. Cells were harvested after further incubation for 18 h.

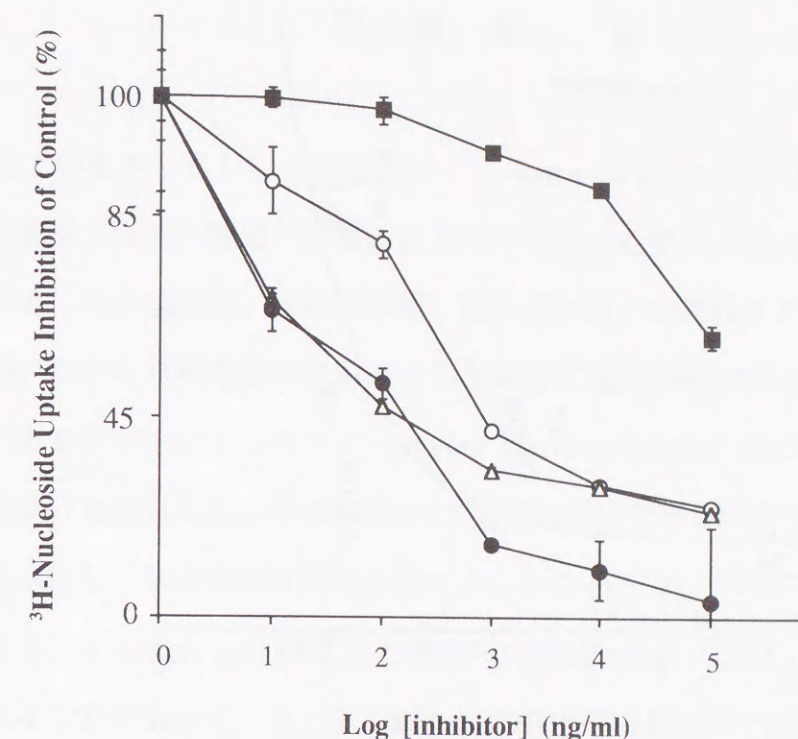


Fig. 34. Effect of cimicifugoside (27) on mitogen-induced proliferation of mouse splenocytes. TdR (Con A) (○), ^3H -TdR uptake inhibition into Con A-stimulated splenocytes; UdR (Con A) (■), ^3H -UdR uptake inhibition into Con A-stimulated splenocytes; TdR (LPS) (△), ^3H -TdR uptake inhibition into LPS-stimulated splenocytes; TdR (PHA) (●), ^3H -TdR uptake inhibition into PHA-stimulated splenocytes. The procedures and conditions of the ^3H -uptake inhibition assay are described in "Materials and Methods." Values are the means \pm S.E. of 3 determinations.

った (EC_{50} 値 $1.3-13.0 \mu\text{M}$: 第一節). 一方, これらのうち, 9 検体 27, 29-34, 36 および 38 にマイトージェン刺激したリンパ球への強いヌクレオシド取り込み阻害活性が認められた (第二節). これらの化合物の ^3H -TdR 取り込み阻害活性 (IC_{50} 値) と, 抗マラリア原虫活性 (EC_{50} 値) の関係を Fig. 35 に示したが, 両者に密接な相関があることが認められた ($r = 0.679$).

第四節 小結

Thymidine 取り込み阻害は, 哺乳動物リンパ球細胞へのヌクレオシドの選択的な取り込みの阻害であり, L-5178, cl ID などの細胞成長には影響を示さないことから DNA の合成阻害でないと考えられる¹⁶⁾. この仮説は, 合わせて測定した 27, 29-

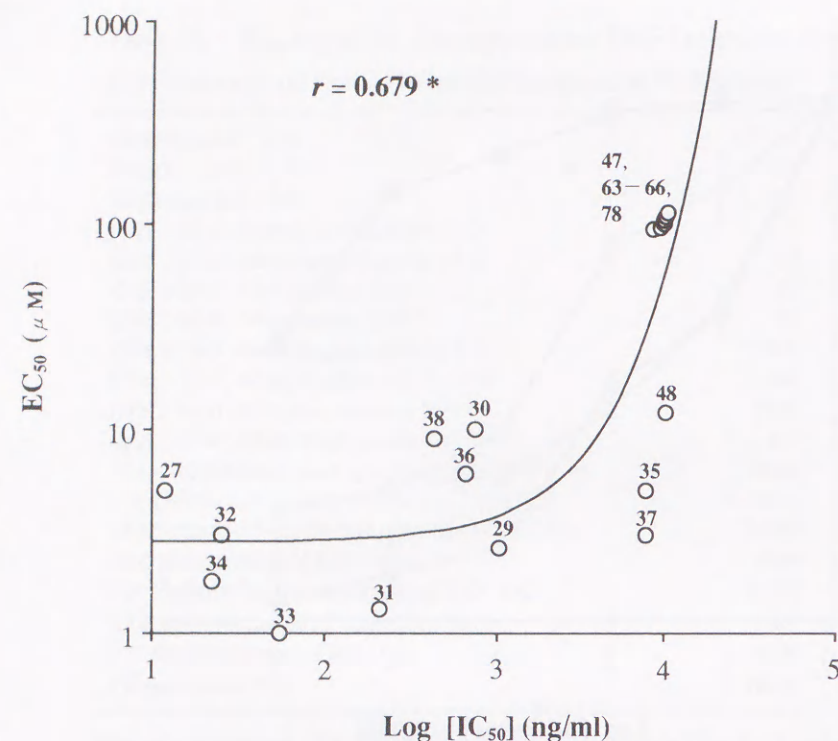


Fig. 35. Relationship between ^3H -TdR transport inhibition (IC_{50}) and antimalarial activity (EC_{50}) of compounds 27, 29–38, 47, 48, 63–66 and 78. The procedures and conditions of the ^3H -TdR transport inhibition assay are described in "Materials and Methods", and the data of the transport inhibition and antimalarial activity are as described in Tables 10 and 11. An asterisk indicates significance by the bivariate normal distribution t -test, $p < 0.05$.

36, 47, 48, 63–66 および 78 の MTT アッセイ結果 (IC_{50} 値 ≥ 1.0 – $10.0 \mu\text{g/ml}$) からも支持された。マラリア原虫は *de novo* のヌクレオシド合成系を欠いており、ヌクレオシドを宿主から取り込んで合成している⁵⁷⁾。今回の研究は cemicifugoside (27) のような強いヌクレオシド取り込み阻害活性を有する化合物が、抗マラリア原虫活性を有するかどうかを調べるのが目的であった。抗マラリア原虫活性の高かった 25 検体のトリテルペノイドは、側鎖に 16:23;23:26;24:25-triepoxy 構造を有し、それらがまたヌクレオシドの取り込み阻害をしたことは興味深い。それらの部分構造が、ヌクレオシドの ribose 部分の構造に似ており、構造活性相関の解明のヒントとなり得るものと考えられる。

第八章 結 論

升麻は「神農本草経」に上品として「あらゆる毒を解し、鎮痛、解熱の効がある」とされ、消炎・解熱・解毒・止血効果を期待して、乙字湯、散腫潰堅湯、紫根牡蛎湯、除湿補気湯、補中治湿湯、升麻葛根湯、補中益気湯、立効散などに配合されている。

筆者は、これらの薬理作用に關与する生物活性成分の探索を目的として、升麻の基原植物であるサラシナショウマ *C. simplex* Wormskj. 地下部に含まれる水溶性タンニン活性成分に着目した。その結果、11 種の新規化合物を含む 26 種の水溶性芳香族成分を見出し、単離または同定した。これらの多くは、升麻の抗炎症・抗浮腫作用の本体とされる caffeic acid 誘導体とそれらの fukiic acid および piscidic acid とのエステル誘導体などであった。また、これらの成分は他の数種の *Cimicifuga* 属植物にも共通する成分として含まれており、cemicifugic acid D と fukinolic acid とにラット大動脈血管平滑筋の NE による収縮に対して収縮抑制作用が、cemicifugic acid C に血管収縮作用が見い出された。さらに、cemicifugic acid A と fukinolic acid とに植物種子に対する顕著な発芽抑制作用が認められ、また α -amylase および carboxypeptidase A に対しては強い阻害活性を有することが明らかとなった。一方、サラシナショウマ属植物から得られたトリテルペン系化合物に抗マラリア原虫作用が見い出され、ヌクレオシドの選択的取り込み阻害との関係を明らかにした。

筆者は本研究で、今日までその分離・精製が困難なために、重要と認識されつつも解明の遅れていたサラシナショウマ地下部の水溶性の生物活性成分に着目し、その単離を試みた。まず、サラシナショウマ地下部のメタノールエキスを水—(*n*-ブタノール—酢酸エチル) により分配し、水層を HP-20 カラムクロマトに通導し、吸着部分に多数の水溶性芳香族成分が含まれることを見出した。この吸着成分中に生物活性成分が含まれることを想定し、新たな分取条件を用いることで、cimifugin と共に 23 種の目的成分を単離・精製することに成功した。

これらの成分は、isoferulic acid および ferulic acid を中心とする caffeic acid 誘導体と、fukinolic acid および 10 種の新規 fukiic, piscidic acid のエステル誘導体などであった。特に fukinolic acid, 3 種の新規 fukiic acid エステル (cimicifugic acid A-C と命名) および 3 種の新規 piscidic acid エステル (cimicifugic acid D-F と命名) が高い含率で含まれていた。Isoferulic acid は升麻の抗炎症作用の本体とされ、caffeic acid 誘導体には多くの薬理活性が報告されている。また、fukiic acid および piscidic acid は、リン酸の吸収を高める物質として知られている。それらが升麻にエステル体として高い成分含量で含まれることが明らかとなり、升麻の薬効成分あるいは活性成分のプロ体として期待される。さらに、その他の水溶性芳香族成分としては、抗変異原性作用が期待される新規 oxopropyl isoferulate (cimiciphenol と命名) そして 2 種のクロモン配糖体 および 2 種のフラボノール配糖体がサラシナショウマから初めて見い出され、chlorogenic acid の存在も明らかとなった。また、cimicifugic acid A-F および cimiciphenol の生合成については、合成中間体である eucomic acid および hydroxyeucomic acid の存在を明らかにすることにより、シキミ酸経路により形成された shikimic acid が、 α -keto acid を経てこれらの化合物が生成する経路が推定される。

一方、サラシナショウマから得られた 23 種の芳香族成分について、3 種の日本産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica*) 地下部および 3 種の中国産 *Cimicifuga* 属植物 (*C. heracleifolia*, *C. foetida*, *C. dahurica*) の根茎の水-メタノール (1:1) のエキスを、新たな HPLC 条件により比較分析した。その結果、これらの 23 種の成分の大多数が *Cimicifuga* 属植物に共通成分として含まれており、特に fukinolic acid, cimicifugic acid A, B, D, E および F は含率が高く、かつ *Cimicifuga* 属植物の種の違いによって特徴的は成分含量を示すことが見い出された。現在、升麻の市場品は、上記 3 種の中国産升麻であり、日本産サラシナショウマはほとんど流通していない。今回の研究結果は、升麻の確認試験法を確立するために、あるいは基原植物を識別するために有用であると共に、これまで未解決のまま残されていた水溶性成分の解明を大きく前進させるものと考えられる。

また、今回得られた芳香族成分の中で fukinolic acid および cimicifugic acid A-E のラット摘出大動脈血管平滑筋標本に対する作用を検討した結果、fukinolic acid と cimicifugic acid D とは、NE による血管平滑筋の tonic 相の収縮に対し各々 3.0×10^{-4} M の濃度で持続性の収縮抑制作用を示した。その作用機序を詳細に検討し、それが VDC の阻害ではなく、ROC を介した細胞内への Ca^{2+} の流入阻害であることが明らかとなった。さらに、cimicifugic acid 関連化合物の血管に対する作用には、fukiic acid (または piscidic acid) にエステル結合する芳香族カルボン酸のベンゼン環置換様式が大きく影響することが明らかとなった。さらに、cimicifugic acid C には 1.0×10^{-5} – 3.0×10^{-4} M の濃度で血管収縮作用が見い出された。また、cimicifugic acid A および fukinolic acid は 4 種の植物種子に対し、 1.0×10^{-4} – 3.0×10^{-4} M の濃度において顕著な発芽抑制作用を示し、caffeic acid の有する発芽抑制作用が fukiic acid とエステル結合することで増強されていた。また、cimicifugic acid A は α -amylase および carboxypeptidase A に対し強い阻害活性を示し、 IC_{50} 値は各々 2.4×10^{-5} M および 2.0×10^{-4} M であった。また、fukinolic acid のそれぞれに対する IC_{50} 値は 4.0×10^{-5} M および 1.7×10^{-4} M であり、両化合物ともに各々の対照化合物よりも強い阻害活性が認められた。

一方、サラシナショウマ属植物の成分研究の過程で得られたトリテルペノイド 59 検体についてマラリア原虫活性を評価したところ、25 検体について EC_{50} 値が 1.3 – $13.0 \mu\text{M}$ の活性が認められた。これらの活性化合物のうち 19 種の化合物は共通の hemiacetal 側鎖構造を有しており、そのうち 9 種の化合物に IC_{50} 値が 17.8 nM – $1.7 \mu\text{M}$ のヌクレオシド取り込み阻害活性が認められた。さらに、このヌクレオシドの取り込み阻害活性と抗マラリア原虫活性との間に密接な相関関係が明らかとなった。

今回の研究の結果が、生薬升麻の薬理作用の解明に大きく寄与するものと期待される。

謝 辞

本論文作成にあたり、御指導と御校閲を賜りました東北大学薬学部生物薬品製造学教室 大泉 康教授に厚く御礼申し上げます。また、懇切なる御校閲と御指導を賜りました東北大学薬学部生物薬品化学教室 大島吉輝教授ならびに同大学生体機能分子薬学教室 永沼 章教授に心より御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、御指導と御校閲を賜りました大阪薬科大学第一生薬学教室 草野源次郎教授に心より御礼申し上げます。また、大阪薬科大学 稲森喜彦教授、星薬科大学 永井正博教授、桜井信子助教授、塩野義製薬株式会社創薬第二研究所 鈴木隆二博士ならびに同社創薬第二研究所 小泉謙三氏に深く感謝いたします。また、抗マalaria原虫活性を測定していただいた、岡山大学薬学部 綿矢有佑教授ならびに金 恵淑博士に感謝いたします。さらに、本研究を推進するに際しては、多くの御助言と御協力を賜りました、大阪薬科大学第一生薬学教室 草野昭子研究生、芝野真喜雄助手、柳 正和院生ならびに塚本大介院生の皆様に感謝いたします。

本研究を行う機会を与えていただきました、塩野義製薬株式会社代表取締役社長 塩野芳彦氏、同社常務取締役製造本部長 前田 孝博士、また、数々の御助言と御指導を賜りました塩野義製薬株式会社製薬技術部長 片岡隆博博士に深く感謝いたします。さらに、本論文作成にあたり御指導、御鞭撻をいただきました日亜薬品工業株式会社社長 上尾庄一郎博士、塩野義製薬株式会社医薬研究開発本部 尾上 弘博士、同社製薬研究所長 鴻池敏郎博士ならびに同社製薬研究所部門長 國領芳嗣氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究中終始暖かい励ましを続けてくれた妻 高平裕子に心より感謝いたします。

1999 年 4 月

実 験 の 部

実験の部

融点は、柳本微量融点測定器で測定し、未補正ある。UV スペクトルは島津 UV-2100 (25℃), $[\alpha]_D$ は JASCO デジタル polarimeter (25℃) で測定した。IR スペクトルは Perkin-Elmer 1720X-FT IR で測定、さらに MS スペクトルは、日立 M-80 スペクトロメーターで測定した。 $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ は Varian Gemini-300BB (300 と 74.5 MHz) と JEOL α -400 (400 と 100.4 MHz) を使用し、両者とも内部標準は tetramethylsilane (TMS) で、ケミカルシフトは δ 値 (ppm) で表記した。また、s: singlet, d: doublet, t: triplet, dd: double doublet, m: multiplet とした。カラムクロマトグラフィーは、ダイアイオン HP-20 (三菱化学, 東京), Wakogel C-200 (和光純薬, 大阪) および ODS-A YMC (YMC Co. Ltd., 京都) を用いた。HPLC は、JASCO PU-980 型ポンプ, JASCO 875-UV 検出器 (UV 検出波長 254, 280 nm) または JASCO Model 807-IT インテグレーターを使用した。TLC は、順相用 Merck plate silicagel 60F₂₅₄ (0.25 mm) または逆相用 Merck HPTLC plate RP-8F₂₅₄S (0.25 mm) を用い、展開溶媒として、 CHCl_3 -MeOH (1:99) または MeOH-水 (1:1) を用いた。化合物の検出には、40% H_2SO_4 噴霧後の加熱による発色または 10% FeCl_3 試液による発色および UV ランプ (“National” UV 6W) 照射により行った。

第一節 第二章に関する実験

実験材料として、滋賀県伊吹山地区に自生するサラシナショウマ (*C. simplex*) を、大阪薬科大学 (大阪府松原市) で数年間栽培したものを用いた。また、本植物は、地上部の形態の特徴により同定されたが、一方では乾燥した地下部の MeOH または EtOAc エキスの TLC 分析および HPLC 分析結果からも同定された。

成分 1-20 および cimifugin の抽出・単離

乾燥したサラシナショウマ地下部の粉末 (1.1 kg) を、室温下 MeOH で 1 日、3 回抽出 (51×3 回) した。その MeOH 抽出液を減圧下濃縮し、粘調の濃縮物を得た (ca.

300 ml)。その濃縮液を水 (100 ml) に懸濁後, *n*-BuOH-EtOAc (1:1) (200 ml) で3回抽出し, 分配後の水層中の溶存有機溶媒を減圧下留去後, ダイアイオン HP-20 カラム (500 ml, i. d. 5.5×70 cm) に通導した。水 (3 l) で洗浄後, 吸着部を MeOH (500 ml) で溶出。MeOH 溶出部を減圧下濃縮し, 得られた褐色ジャム状のエキスを MeOH-水 (2:1) に溶解し, ODS カラムクロマトグラフィー (80 g, i. d. 3.0×20 cm) に付した。MeOH-水 (2:1-1:0) 溶出画分を減圧下乾固後, 褐色ジャム状残留物 13.5 g を得た。その残留物の一部 (3 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (90 g, i. d. 4.0×20 cm) に付し, CHCl₃-MeOH (2:1) 溶出画分より cimifugin (15 mg) および **20** (152 mg) を得た。さらに, CHCl₃-MeOH (1:2) 溶出画分よりジャム状の褐色濃縮物 (1.0 g) を得, これを 1N HCl (15 ml) -水 (50 ml) で希釈後, ダイアイオン HP-20 (i. d. 3×20 cm) カラムクロマトグラフィーに付した。その水溶出画分は, 主に arginine および少量の histidine を含み, TLC, NMR スペクトルおよびアミノ酸分析により, 各々の標品と比較することにより同定した。さらに, MeOH-水 (5:1-1:0) 溶出画分を分取用 HPLC [カラム, Cosmosil 5C18-AR (10 μm, i. d. 10.0×250 mm) または Cosmosil 10Ph (10 μm, i. d. 8.0×250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN-1% AcOH (5→45); 50 分間のグラジエント; カラム温度, 40°C; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 254 nm] に付し, **1-20** および cimifugin を得た。分画過程の概略は Fig. 3 に, また, 分取時の HPLC profile の一例は Fig. 4 に示した。

分取用 HPLC クロマトでは, 次 *t_R* の順に溶出した。すなわち, MeCN-1% AcOH (5:95-20:80) 溶出画分を減圧下濃縮後, fukiic acid (**5**, 10 mg), piscidic acid (**9**, 3 mg), caffeic acid (**10**, 23 mg), *p*-coumaric acid (**14**, 4 mg), **20** (55 mg), ferulic acid (**11**, 18 mg), isoferulic acid (**12**, 8 mg), fukinolic acid (**4**, 24 mg) および cimicifugic acid D (**6**, 20 mg) をこの順に得た。また, MeCN-1% AcOH (20:80-45:65) 溶出画分より, cimicifugic acid C (**3**, 15 mg), cimicifugic acid A (**1**, 25 mg), cimigcifugic acid B (**2**, 11 mg), 3,4-dimethoxycinnamic acid (**13**, 3 mg), cimicifugic acid E (**7**, 20 mg), cimicifugic acid F (**8**, 8 mg), **17** (4 mg), **18** (4 mg), **15** (10 mg), **16** (3 mg) お

よび **19** (7 mg) をこの順に得た。

Cimifugin : MeOH より再結晶し, 無色針状晶として得た。mp 109-111°C, $[\alpha]_D^{25} +79.4^\circ$ (*c*=0.54), C₁₆H₁₈O₆, positive (= pos.) SIMS *m/z*: 307 [M+H]⁺. IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3370 (OH), 1657, 1625, 1583. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.27, 1.41 (each 3H, s, *gem*-(CH₃)₂), 3.28 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3'), 3.95 (3H, s, OCH₃), 4.52 (2H, br s, 2-CH₂OH), 4.75 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, H-2'), 6.29 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, s, H-8). 本化合物は, 標品との直接比較により cimifugin と同定した。

Caffeic acid (10) : MeOH より再結晶し, 灰褐色粉末状晶として得た。mp 223-225°C, *t_R* 13.8 min, C₉H₈O₄, pos. SIMS *m/z*: 181 [M+H]⁺. ¹H-NMR (D₂O) δ: 6.31 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-2), 6.90 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5'), 7.08 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, H-6'), 7.17 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.56 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-3). 本化合物は, 標品との直接比較により **10** と同定した。

Ferulic acid (11) : MeOH より再結晶し, 灰白色粉末状晶として得た。mp 172-174°C, *t_R* 23.6 min, C₁₀H₁₀O₄, pos. SIMS *m/z*: 195 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.85 (3H, s, OCH₃), 6.34 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-2), 6.89 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5'), 7.13 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, H-6'), 7.24 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.60 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-3). 本化合物は, 標品との直接比較により **11** と同定した。

Isoferulic acid (12) : MeOH より再結晶し, 灰白色粉末状晶として得た。mp 231°C, *t_R* 25.0 min, C₁₀H₁₀O₄, pos. SIMS *m/z*: 195 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.84 (3H, s, OCH₃), 6.34 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-2), 7.03 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5'), 7.17-7.15 (2H, m, H-2', 6'), 7.53 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-3). 本化合物は, 標品との直接比較により **12** と同定した。

3,4-Dimethoxycinnamic acid (13) : MeOH より再結晶し, 白色粉末状晶として得た. mp 182-184°C, t_R 36.1 min, $C_{11}H_{12}O_4$, pos. SIMS m/z : 209 $[M+H]^+$. 1H -NMR (CD_3OD) δ : 3.85 (6H, s, $OCH_3 \times 2$), 6.34 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-2), 6.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 7.15 (1H, dd, $J=8.8, 2.0$ Hz, H-6'), 7.17 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.59 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-3). 本化合物は, 標品との直接比較により **13** と同定した.

p-Coumaric acid (14) : MeOH より再結晶し, 微黄白色粉末状晶として得た. mp 213-214°C, t_R 19.0 min, $C_9H_8O_3$, pos. SIMS m/z : 165 $[M+H]^+$. 1H -NMR (CD_3OD) δ : 6.26 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-2), 6.79 (2H, d, $J=9.1$ Hz, H-3', 5'), 7.42 (2H, d, $J=9.1$ Hz, H-2', 6'), 7.59 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-3). 本化合物は, 標品との直接比較により **14** と同定した.

成分 21-23 の単離

ODS カラムクロマトグラフィーで MeOH-水 (2:1-1:0) 溶出画分の濃縮物 (1.9 g) を 1N HCl (50 ml) -水 (60 ml) で希釈後, EtOAc (100 ml \times 3 回) で室温下抽出した. その水層をダイアイオン HP-20 カラム (i. d. 3 \times 20 cm) に通導し, MeOH-水 (5:1-1:0) 溶出画分より得られる濃縮物 (155 mg) を分取用 HPLC [カラム, Cosmosil 5C18-AR (10 μ m, i. d. 10.0 \times 250 mm: ナカライテスク, 京都) または Cosmosil 10Ph (10 μ m, i. d. 8.0 \times 250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN-1% AcOH (5:95 \rightarrow 28:72); 50 分間のグラジエント; カラム温度, 40°C; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 254 nm] に付した. この分取条件により, **20** (45 mg), **23** (9 mg), **21** (31 mg) および **22** (36 mg) をこの順に得た.

成分 24-26 の同定

ODS カラムクロマトグラフィーで MeOH-水 (2:1-1:0) 溶出画分の濃縮物 (1.9 g) を 1N HCl (50 ml) -水 (60 ml) で希釈後, EtOAc (100 ml \times 3 回) で室温下抽出した. その水層をダイアイオン HP-20 カラム (i. d. 3 \times 20 cm) に通導し, MeOH-水

(4:1) 溶出画分より得られる濃縮液 (30 mg) を得た. この濃縮液を HPLC 分析 [カラム, Cosmosil 10Ph (10 μ m, i. d. 8.0 \times 250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN-1% AcOH (5:95-10:90); 50 分間のグラジエント; カラム温度, 40°C; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 254 nm] に付し, **24**, **25** および **26** を各々の標品との重ね打ちにより同定した. なお, 標品の eucomic acid (**24**), hydroxyeucomic acid (**25**) は, *Cattleya* spp. (大阪薬科大学薬用植物園栽培品, 1998 年 5 月採集) から単離し, 各々のスペクトルデータが文献値³³⁾ と一致することを認めた. また, chlorogenic acid (**26**) は, 購入品 (Fuluka, cat. no. 25700, USA) を用いて比較同定した.

第二節 第三章に関する実験

Cimicifugic acid A (1) : $CHCl_3$ -MeOH より吸湿性の微黄色粉末として得られ, $FeCl_3$ 試薬により紫褐色を呈した. t_R 26.1 min, $[\alpha]_D^{+47.8}$ ($c=0.90$, MeOH at 25°C), UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 328 (4.28), 287 sh (4.08), 234 (4.16). $C_{21}H_{20}O_{11}$, pos. HR-SIMS m/z : 449.1076 $[(M+H)^+]$, error: -0.6 mmu, pos. SIMS m/z : 449 ($M+1$)⁺ (8.2%), 194 (12.0), 177 (100), 123 (15.6), 86 (18.3), 70 (20.9). IR KBr cm^{-1} : 3400 (OH), 1714, 1629 (conjugated C=O), 1600, 1516 (aromatic ring), 1449. 1H -NMR および ^{13}C -NMR (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 1 および 2.

Cimicifugic acid B (2) : $CHCl_3$ -MeOH より吸湿性の微黄色粉末として得られ, $FeCl_3$ 試薬により紫褐色を呈した. t_R 27.0 min, $[\alpha]_D^{+42.5}$ ($c=0.51$, MeOH at 25°C), UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 313 (4.27) nm, 286 sh (4.16), 224 (4.23). $C_{21}H_{20}O_{11}$, pos. HR-SIMS m/z : 449.1078 $[(M+H)^+]$, error: -0.4 mmu, pos. SIMS m/z : 449 ($M+1$)⁺ (7.6%), 225 (12.1), 177 (25.9), 133 (100), 123 (5.4), 86 (3.0). IR KBr cm^{-1} : 3400 (OH), 1715, 1609 (conjugated C=O), 1515 (aromatic ring), 1443. 1H -NMR および ^{13}C -NMR (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 1 および 2.

Cimicifugic acid C (3) : CHCl_3 —EtOAc より吸湿性の微黄色粉末として得られ、 FeCl_3 試薬により紫褐色を呈した。 t_R 34.6 min, $[\alpha]_D^{25} +38.7^\circ$ ($c=0.34$, MeOH at 25°C), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 313 (4.27) nm, 286 sh (4.16), 224 (4.23). $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$. pos. HR-SIMS m/z : 419.0973 [(M+H)⁺, error: -0.4 mmu], pos. SIMS m/z : 419 (M+1)⁺ (15.0%), 163 (9.1), 147 (100), 123 (22.0), 86 (35.8), 70 (35.5). IR KBr cm^{-1} : 3405 (OH), 1713, 1630, 1605 (conjugated C=O), 1516 (aromatic ring), 1447. $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 1 および 2.

Fukinolic acid (4) : CHCl_3 —MeOH より吸湿性の微黄色粉末として得られ、 FeCl_3 試薬により紫褐色を呈した。 t_R 27.9 min, $[\alpha]_D^{25} +51.2^\circ$ ($c=0.59$, MeOH at 25°C). $[\alpha]_D^{25} +71.2^\circ$ ($c=1.0$, H_2O at 20°C), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 332 (4.26) nm, 291 (4.13), 248 sh (4.02). $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$. pos. HR-SIMS m/z : 435.0934 [(M+H)⁺, error: 0.8 mmu]. pos. SIMS m/z : 435 (M+H)⁺ (22.4%), 163 (100), 123 (11.3), 86 (17.4). IR KBr cm^{-1} : 3438 (OH), 1713, 1605 (conjugated C=O), 1523 (aromatic ring), 1447. **4** はフキ *Petasites japonicus* から得た標品と、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル, IR スペクトルおよび HPLC の t_R 値を直接比較することで fukinolic acid と同定した。 $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 1 および 2.

1, 2, 3 および 4 のアルカリ加水分解

1 (25 mg) を窒素気流下, 2N NaOH (2 ml) を加え溶解し, 室温下 5 時間反応後, 反応終了液を 2N HCl で pH 2.5 とし, EtOAc (30 ml×3 回) で抽出した。有機層を水で洗浄, 無水 MgSO_4 で脱水後減圧下濃縮し, 濃縮物を MeOH より再結晶し, ferulic acid (**11**, 7 mg) を得た。 **11** は, mp $172\text{--}174^\circ\text{C}$ を有し, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル, IR スペクトルおよび HPLC の t_R 値を標品との直接比較により同定した。一方, 上記抽出操作で得られた水層をダイアイオン HP-20 カラム (i.d. 1×10 cm) に通導した。溶出液が中性になるまで水で溶出後, 吸着部を MeOH—水 (1:4—0:1) で溶出し,

溶出画分を減圧下濃縮後, 分取用 HPLC [カラム, Cosmosil 5C18-AR ($10\ \mu\text{m}$, i.d. 10.0×250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN—1% AcOH (5:95); カラム温度, 40°C ; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 280 nm] に付した。この溶出画分より fukiic acid (**5**, 10 mg) が得られ, fukinolic acid の加水分解により得た fukiic acid のスペクトルデータとの比較により同定した。 **1** と同様の加水分解により, **2** (15 mg) から isoferulic acid (**12**, 4 mg) と **5** (9 mg) を, **3** (15 mg) から *p*-coumaric acid (**14**, 3 mg) と **5** (5 mg) を, **4** (25 mg) から caffeic acid (**10**, 6 mg) と **5** (9 mg) を各々得た。

Fukiic acid (5) : MeOH より白色シロップ状オイルとして得た。 t_R 3.8 min, $[\alpha]_D^{25} +20.9^\circ$ ($c=0.59$, MeOH at 25°C), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 332 (4.26) nm, 291 (4.13), 248 sh (4.02). $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_8$. pos. HR-SIMS m/z : 273.0536 [(M+H)⁺, error: 0.5 mmu], pos. SIMS m/z : 273 (M+H)⁺ (23.9%), 166 (100), 147 (11.9), 123 (27.5), 86 (18.9). IR KBr cm^{-1} : 3450 (OH), 3400 (OH), 1732 (C=O), 1615, 1520 (aromatic ring), 1471. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 2.95 (1H, d, $J=13.8$ Hz, H-4), 3.09 (1H, d, $J=13.8$ Hz, H-4), 4.50 (1H, s, H-2), 6.59 (1H, dd, $J=7.8, 2.4$ Hz, H-6'), 6.65 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 174.76 (C-1), 76.48 (C-2), 81.34 (C-3), 42.10 (C-4), 176.05 (C-5), 128.70 (C-1'), 118.79 (C-2'), 145.58 (C-3'), 145.03 (C-4'), 115.92 (C-5'), 123.00 (C-6'). これらのデータより, **5** を fukiic acid ²²⁾ と同定した。

Cimicifugic acid D (6) : CHCl_3 —MeOH より吸湿性の微黄色粉末として得られ、 FeCl_3 試薬により紫褐色を呈した。 t_R 32.2 min, $[\alpha]_D^{25} +67.3^\circ$ ($c=0.34$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 332 (4.25), 291 (4.07), 248 sh (4.02). $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$. HR-SIMS m/z : 419.0973 [(M+H)⁺, error: -0.4 mmu], SIMS m/z : 419 (M+1)⁺ (2.1%), 163 (100), 107 (5.4), 86 (15.9), 44 (4.4), 30 (3.3). IR KBr cm^{-1} : 3416 (OH), 1698, 1658 (conjugated C=O), 1601, 1516 (aromatic ring). $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Cimicifugic acid E (7) : CHCl_3 -MeOH より吸湿性の微黄色粉末として得られ, FeCl_3 試薬により紫褐色を呈した. t_R 40.5 min, $[\alpha]_D + 50.3^\circ$ ($c=0.21$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 325 (4.16), 291 (3.98). $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. HR-SIMS m/z : 433.1132 [(M+H) $^+$, error: -0.2 mmu], SIMS m/z : 433 (M+1) $^+$ (12.9%), 194 (13.8), 177 (100), 110 (18.5), 107 (19.7), 86 (71.8), 70 (85.1), 45 (18.4), 30 (10.0). IR KBr cm^{-1} : 3430 (OH), 1717 (conjugated C=O), 1596, 1559 (aromatic ring). $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Cimicifugic acid F (8) : CHCl_3 -MeOH より微黄色粉末として得られ, FeCl_3 試薬により紫褐色を呈した. t_R 41.9 min, $[\alpha]_D + 37.6^\circ$ ($c=0.52$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 326 (4.25), 297 (4.19), 245 sh (4.10). $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. HR-SIMS m/z : 433.1138 [(M+H) $^+$, error: 0.5 mmu], SIMS m/z : 433 (M+1) $^+$ (4.6%), 194 (6.2), 177 (100), 107 (7.3), 86 (74.4), 70 (80.2). IR KBr cm^{-1} : 3429 (OH), 1715 (conjugated C=O), 1614, 1515 (aromatic ring). $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Piscidic acid (9) : CHCl_3 -MeOH より褐色粉末として得た. t_R 6.5 min, $[\alpha]_D + 42.8^\circ$ ($c=0.80$, MeOH). The reported $[\alpha]_D + 41.0^\circ$ ($c=2.65$, H_2O at 20°C). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 277.5 (3.17), 255 (3.88). $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_7$. HR-SIMS m/z : 257.0667 [(M+H) $^+$, error: 0.7 mmu], SIMS m/z : 257 (M+H) $^+$ (13.5%), 231 (100), 107 (17.8), 86 (75.9), 72 (62.5), 45 (18.3), 30 (10.5). IR KBr cm^{-1} : 3450 (OH), 3400-2450 (OH, COOH), 1729 (conjugated C=O), 1615, 1595, 1515 (aromatic ring), 1447. $^1\text{H-NMR}$ δ : 2.97 (2H, m, H-4), 4.55 (1H, s, H-2), 6.72 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-3', 5'), 7.04 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-2', 6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 174.88 (C-1), 76.57 (C-2), 81.44 (C-3), 41.98 (C-4), 176.18 (C-5), 128.10 (C-1'), 132.16 (C-2'), 116.24 (C-3'), 156.53 (C-4'), 116.24 (C-5'), 132.16 (C-6'). これらのデータより, **9** を piscidic acid ²⁷⁾ と同定した.

Compound 15 : CHCl_3 -EtOAc より微黄色粉末として得た. t_R 48.3 min, $[\alpha]_D + 32.8^\circ$ ($c=0.33$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 326.5 (4.24), 292.5 sh (4.07), 246 sh (4.03). $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. HR-SIMS m/z : 447.1299 [(M+H) $^+$, error: 1.0 mmu], SIMS m/z : 447 (M+1) $^+$ (2.3%), 319 (7.6), 182 (24.8), 177 (100), 107 (20.0), 81 (20.2), 69 (29.0), 56 (25.2), 42 (23.8). IR KBr cm^{-1} : 3424 (OH), 1720 (ester C=O, carbonate), 1596, 1516 (aromatic ring), 1439. $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Compound 16 : CHCl_3 -EtOAc より微黄色粉末として得た. t_R 51.3 min, $[\alpha]_D + 33.6^\circ$ ($c=0.20$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 325 (3.97), 295.5 (3.93), 245 sh (3.92). $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. HR-SIMS m/z : 447.1289 [(M+H) $^+$, error: 0.0 mmu], SIMS m/z : 447 (M+1) $^+$ (3.5%), 319 (12.8), 201 (18.2), 177 (100), 115 (22.4), 107 (20.3), 81 (13.0), 69 (20.2), 56 (20.0), 44 (40.0). IR KBr cm^{-1} : 3455 (OH), 1721 (ester C=O, carbonate), 1611, 1515 (aromatic ring), 1440. $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Compound 17 : CHCl_3 -EtOAc より微黄色粉末として得た. t_R 43.0 min, $[\alpha]_D + 41.3^\circ$ ($c=0.42$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 327.5 (4.36), 291.5 (4.25), 235.5 sh (4.36). $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. HR-SIMS m/z : 463.1248 [(M+H) $^+$, error: 0.9 mmu], SIMS m/z : 463 (M+1) $^+$ (5.3), 177 (100), 163 (16.9), 123 (14.2), 86 (5.0), 44 (9.0). IR KBr cm^{-1} : 3425 (OH), 1722 (ester C=O, carbonate), 1601, 1516 (aromatic ring), 1448. $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

Compound 18 : CHCl_3 -EtOAc より微黄色粉末として得た. t_R 44.9 min, $[\alpha]_D + 36.4^\circ$ ($c=0.37$, MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 325.5 (4.22), 290 (4.19), 235 sh (4.30). $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. HR-SIMS m/z : 463.1234 [(M+H) $^+$, error: -0.5 mmu], SIMS m/z : 463 (M+1) $^+$ (4.7%), 177 (100), 163 (22.1), 123 (16.1), 86 (12.0), 44 (34.4). IR KBr cm^{-1} : 3413 (OH), 1723

(ester C=O, carbonate), 1606, 1516 (aromatic ring), 1444. $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) スペクトル δ : Tables 3 および 4.

6, 7, 8, 15, 16, 17 および 18 のアルカリ加水分解

6 (15 mg) を窒素気流下, 2N NaOH (2 ml) を加え溶解し, 室温下 5 時間反応した. 反応終了液を 2N HCl で pH 2.5 とし, EtOAc (30 ml \times 3 回) で抽出した. 有機層を水で洗浄, 無水 MgSO_4 で脱水後減圧下濃縮し, 濃縮物を MeOH より再結晶して caffeic acid (10, 4 mg) を得た. 10 は, mp 213°C を有し, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル, IR スペクトルおよび HPLC の t_R 値を標品と直接比較し同定した. 一方, 上記操作で得られた水層をダイアイオン HP-20 カラム (i.d. 1 \times 10 cm) に通導し, 溶出液が中性になるまで水で溶出後, 吸着部を MeOH-水 (1:4-0:1) で溶出した. 溶出画分を減圧下濃縮後, 濃縮液を分取用 HPLC [カラム, Cosmosil 5C18-AR (10 μ m, i.d. 10.0 \times 250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN-1% AcOH (5:95); カラム温度, 40°C; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 280 nm] に付した. この溶出画分 (t_R 6.5 min) より piscidic acid (9, 6 mg) を得, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル, IR スペクトルおよび HPLC の t_R 値を標品と直接比較し同定した. 6 と同様に, 2N NaOH による加水分解反応を行い, 7 (10 mg) から ferulic acid (11, 2 mg) と 9 (3 mg) を, 8 (9 mg) から isoferulic acid (12, 2 mg) と 9 (5 mg) を各々得た. 同様の加水分解を 15-18 で行い, HPLC 分析により, 15 から 9 と 11 を, 16 から 9 と 12 を, 17 から fukiic acid (5) と 11 を, 18 から 5 と 12 を各々 1:1 のモル比で検出した.

Compound 19 : MeOH より再結晶し, 微黄色針状晶として得た. t_R 54.2 min, mp 159-160°C, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 327 (4.33), 293 (4.30), 244.5 sh (4.20). $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$, pos. HR-SIMS m/z : 359.1112 [(M+H) $^+$, error: -1.7 mmu], pos. SIMS m/z : 359 [(M+H) $^+$ (11.4%), 194 (4.2), 178 (12.4), 177 (100), 161 (2.5), 137 (6.6), 123 (4.5). IR $_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3443 (OH), 1731 (C=O), 1709, 1637 (conjugated C=O), 1580, 1511 (aromatic ring), 1446. $^1\text{H-NMR}$

(CD_3OD) δ : 7.60 (1H, d, $J=16.2$ Hz, H-3"), 7.08 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2"), 7.06 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-6"), 6.94 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5"), 6.73 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.58 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-6'), 6.36 (1H, d, $J=16.2$ Hz, H-2"), 4.87 (2H, br s, H-1), 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.63 (2H, br s, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 68.77 (C-1), 204.86 (C-2), 46.59 (C-3), 126.24 (C-1'), 117.86 (C-2'), 146.85 (C-3'), 145.29 (C-4'), 116.84 (C-5'), 122.27 (C-6'), 168.44 (C-1"), 115.06 (C-2"), 147.76 (C-3"), 129.00 (C-1"), 115.42 (C-2"), 148.27 (C-3"), 151.95 (C-4"), 112.73 (C-5"), 123.29 (C-6"), 56.64 (OCH_3). MS fragment ions, HMBC スペクトルおよび ROE: Fig. 13.

Compound 20 : MeCN-MeOH より微黄色粉末として得た. t_R 30.4 min, $[\alpha]_{\text{D}} +12.6^\circ$ ($c=0.75$, CHCl_3), $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$, pos. SIMS m/z : 469 [(M+H) $^+$ (100%), 409 (3.6), 335 (7.5), 290 (17.8), 247 (2.5), 217 (3.2), 189 (3.2), 60 (12.5). IR $_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3700-3500 (OH), 1660, 1628, 1610. $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 1.41, 1.51 (each 3H, s, $\text{gem}-(\text{CH}_3)_2$), 4.02 (3H, s, OMe), 4.78 (2H, br s, 2- CH_2OH), 4.75 (1H, t, $J=8.9$ Hz, H-2'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.75 (1H, s, H-8), 4.96 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1"), 3.98-4.56 (5H, m, H-2"-H-6"). これらのスペクトルデータを標品と直接比較し, 20 を *prim-O-glucosylcimifugin*²⁹⁾ と同定した.

Compound 21 : MeOH より白色針状晶として得た. t_R 33.0 min, mp 130-131°C, $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$, pos. HR-SIMS m/z : 409.1131 [(M+H) $^+$, error: -0.2 mmu], pos. SIMS m/z : 431 [(M+Na) $^+$]. $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 7.09 (1H, d, $J=0.7$ Hz, H-8), 7.62 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 6.91 (1H, dd, $J=2.4, 0.7$ Hz, H-3'), 6.59 (1H, s, H-3), 4.64 and 4.48 (1H each, d, $J=15.0$ Hz, 11- CH_2O), 3.93 (3H, s, OCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 163.41 (C-2), 109.22 (C-3), 178.48 (C-4), 159.08 (C-5), 116.83 (C-6), 157.55 (C-7), 95.11 (C-8), 155.61 (C-9), 112.50 (C-10), 65.68 (C-11), 146.62 (C-2'), 105.69 (C-3'), 102.41 (C-1"), 73.28 (C-2"), 76.41 (C-3"), 70.07 (C-4"), 76.99 (C-5"), 61.31 (C-6"), 61.30 (OCH_3). これらのスペクトルデータを文献値と比較し, 21 を *prim-O-glucosylkhellol*³⁰⁾ と同定した.

Compound 22 : MeOH より微黄色粉末として得た。 t_R 35.4 min, $[\alpha]_D$ -38.0° ($c=0.20$, pyridine). $C_{26}H_{28}O_{15}$. pos. HR-SIMS m/z : 581.1501 [(M+H)⁺, error: -0.4 mmu], pos. SIMS m/z : 581 [M+H]⁺(28.9%), 287 (79.8), 282 (100), 230 (50.4), 115 (28.5). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 8.08 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.46 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 5.29 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1''), 3.98 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1'''). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 156.28 (C-2), 133.20 (C-3), 177.17 (C-4), 160.72 (C-5), 98.75 (C-6), 164.47 (C-7), 93.84 (C-8), 156.39 (C-9), 103.68 (C-10), 120.82 (C-1'), 130.89 (C-2', 6'), 115.03 (C-3', 5'), 159.59 (C-4'), 101.71 (C-1''), 70.93 (C-2''), 72.78 (C-3''), 68.16 (C-4''), 74.40 (C-5''), 67.33 (C-6''), 102.54 (C-1'''), 72.30 (C-2'''), 70.23 (C-3'''), 66.63 (C-4'''), 65.08 (C-5'''). 一方, HMBC スペクトルにおいて, クロスピークが C-3 と H-1'' および C-1''' と H-6'' の間に認められた。 **22** (15 mg) を 0.5N HCl (10 ml) 中, 50°C で 5 時間処理し, kaempferol³¹⁾ (6 mg) と 2 種類の糖を得た。これら 2 種の糖は, HPLC [カラム, Specific Rotation of Chiral Detection (Shodex OR-1) in HPLC (PSPak DC-613); RI detection, Waters 410; 75% MeCN, 1.0 ml/min; カラム温度, 70°C; D(+)-galactose, t_R 12.7 min; L(+)-arabinose, t_R 29.68 min] および TLC [D- galactose, R_f 0.39; L- arabinose, R_f 0.51; *n*-PrOH-水 (85:15)] により標品と直接比較することで, 各々 D(+)-galactose および L(+)-arabinose と同定した。これらのデータより, **22** を kaempferol 3-*O*- β -D-galactopyranosyl- α -L-arabinopyranoside³¹⁾ と結論した。

Compound 23 : MeOH より微黄色粉末として得た。 t_R 31.4 min, $[\alpha]_D$ -12.2° ($c=0.75$, DMSO). $C_{26}H_{28}O_{16}$. pos. HR-SIMS m/z : 597.1456 [(M+H)⁺, error: 0.1 mmu], pos. SIMS m/z : 597 [M+H]⁺(1.5%), 465 (2.9), 207 (53.3), 115 (100). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.61 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, 2.0, H-6'), 7.58 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-6), 5.24 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.94 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1'''). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 156.02 (C-2), 133.20 (C-3), 177.17 (C-4), 160.55 (C-5), 98.35 (C-6), 163.61 (C-7), 93.37 (C-8), 156.02 (C-9), 103.71 (C-10), 120.79

(C-1'), 114.91 (C-2'), 144.33 (C-3'), 147.99 (C-4'), 115.65 (C-5'), 121.65 (C-6'), 101.51 (C-1''), 70.72 (C-2''), 72.60 (C-3''), 68.02 (C-4''), 74.26 (C-5''), 67.16 (C-6''), 102.35 (C-1'''), 72.14 (C-2'''), 70.07 (C-3'''), 66.96 (C-4'''), 64.88 (C-5'''). 一方, HMBC スペクトルにおいて, クロスピークが C-3 と H-1'' および C-1''' と H-6'' の間に認められた。 **23** (5 mg) を 0.5N HCl (10 ml) 中で, 40°C で 5 時間処理し, quercetin³²⁾ (2 mg) および 2 種の糖を得た。これら 2 種の糖は, **22** と同様に HPLC 分析, TLC での H₂SO₄ 噴霧後の呈色および R_f 値を標品と直接比較することで, 各々 D(+)-galactose および L(+)-arabinose と同定した。これらのデータより **23** を, quercetin 3-*O*- β -D-galactopyranosyl- α -L-arabinopyranoside³²⁾ と結論した。

カトレアからの eucomic acid (24) および hydroxyeucomic acid (25) の単離

カトレア *Cattleya trianai* の葉 (生重量 100 g) を細断し, MeOH (500 ml) で加熱還流により抽出した (1 時間, 3 回)。その MeOH 抽出液を減圧下濃縮し, 粘調なエキスを 7.3 g を得た。そのエキスの半量を EtOAc-水 (3:5) (500 ml) で抽出・分配後, 水層を HP-20 カラム (180 ml, i. d. 32×250 mm) に通導し, さらに水 (1 l) で溶出後, 吸着部を MeOH (400 ml) で溶出した。その一部を減圧下濃縮後, 濃縮物約 200 g を 5% MeCN (5 ml) に溶解し, Sep-Pak C-18 カートリッジに通導した。通過液を減圧下濃縮し, 濃縮液を分取用 HPLC [カラム, Cosmosil 10Ph (10 μ m, i. d. 8.0×250 mm); 溶出溶媒 (重量比), MeCN-1% AcOH (5:95-14:86); 50 分間のグラジエント; カラム温度, 40°C; 流量, 2.0 ml/min; 検出波長, 254 nm] に付し, **24** (30 mg) および **25** (10 mg) を各々得た。

Eucomic acid (24) : MeOH より微黄色粉末として得た。 t_R 21.4 min, $[\alpha]_D$ -20.5° ($c=0.55$, MeOH). $C_{11}H_{12}O_6$. pos. SIMS m/z : 241 [M+H]⁺. ¹H-NMR (D₂O) δ : 2.58 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H-4), 2.78 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-2), 2.90 (1H, d, $J=14.2$ Hz, H-2), 3.00 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H-4), 6.70 (2H, d, $J=7.7$ Hz, H-3', 5'), 7.00 (2H, d, $J=7.7$ Hz, H-2', 6').

Hydroxyeucomic acid (25) : MeOH より微黄色粉末として得た。 t_R 17.5 min, $[\alpha]_D^{25} -17.0^\circ$ ($c=0.42$, MeOH). $C_{11}H_{12}O_7$. pos. SIMS m/z : 257 $[M+H]^+$. 1H -NMR (CD_3OD) δ : 2.73 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-4), 2.86 (1H, d, $J=14.0$ Hz, H-2), 3.02 (1H, d, $J=14.0$ Hz, H-2), 3.08 (1H, d, $J=14.0$ Hz, H-4), 6.71 (1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.86 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'). **24** および **25** は各々のスペクトルデータが, 文献値と一致したことより, eucomic acid^{27-b)} および hydroxyeucomic acid³³⁾ と同定した。

第三節 第四章に関する実験

実験材料には, 次の6種8検体を用いた。サラシナショウマ *Cimicifuga (C.) simplex* は, 滋賀県伊吹山地区に自生する日本産を大阪薬科大学 (大阪府松原市) に移植後数年栽培し, その地下部根茎の乾燥品を用いた。イヌショウマ *C. japonica* は, 宮城県作並附近の野生種を, 東北大学薬用植物園に移植後20年以上育成した栽培品で, 1996年10月に採取した。オオバショウマ *C. acerina* は, 神奈川県産の野生種を, 東北大学薬用植物園に移植後20年以上育成した栽培品で, 1996年10月に採取した。大三葉升麻 (関升麻) *C. heracleifolia* (1) は, 新和物産 (大阪) より入手し, EtOAc エキスを調整し, TLC 分析により確認し, 同定した。*C. heracleifolia* (2) は, サントリー株式会社 (大阪) より入手し, EtOAc エキスを調整し, TLC 分析により同様に確認された。升麻 (西升麻) *C. foetida* は, 新和物産 (大阪) より入手し, 西安交通大学の養谷宇教授に依頼確認した。また, EtOAc エキスの TLC 分析からも確認された。興安升麻 (北升麻) *C. dahurica* (1) は, 中国河北省で1996年5月に採集され, 中国薬学アカデミーの肖培根氏が鑑定し, 同定した。大阪薬科大学標本室に保管されている。興安升麻 (北升麻) *C. dahurica* (2) は, 1996年中国 Neimengku の薬店より大阪薬科大学草野源次郎教授が入手し, EtOAc エキスの TLC 分析により確認され, 大阪薬科大学標本室に保管されている。また定量分析には, 次の芳香族化合物 (**1-23**) を標品として用いた。標品: Cimicifugic acid A (**1**), cimicifugic acid B (**2**), cimicifugic acid C (**3**), fukinolic acid (**4**), fukiic acid (**5**), 2-caffeoylpiscidic acid (**6**), 2-feruloylpiscidic

acid (**7**), 2-isoferuloylpiscidic acid (**8**), piscidic acid (**9**), caffeic acid (**10**), ferulic acid (**11**), isoferulic acid (**12**), 3,4-dimethoxycinnamic acid (**13**), *p*-coumaric acid (**14**), 2-feruloylpiscidic acid 1-methyl ester (**15**), 2-isoferuloylpiscidic acid 1-methyl ester (**16**), 2-feruloylfukiic acid 1-methyl ester (**17**), 2-isoferuloylfukiic acid 1-methyl ester (**18**), cimiciphenol (**19**), *prim-O*-glucosylcimifugin (**20**), *prim-O*-glucosylkhellol (**21**), kaempferol 3-*O*- β -D-galactopyranosyl- α -L-arabinopyranoside (**22**) および quercetin 3-*O*- β -D-galactopyranosyl- α -L-arabinopyranoside (**23**)。これらの標品は, 第三章でサラシナショウマ地下部から単離・精製したものをを用いた。

試料溶液の調整

乾燥した *C. simplex*, *C. acerina*, *C. japonica* の地下部, *C. heracleifolia* (1), *heracleifolia* (2), *C. foetida*, *C. dahurica* (1) および *C. dahurica* (2) の根茎を細切し, その1gに水 (10 ml) - MeOH (10 ml) を加えて, 室温で1時間攪拌・抽出した。その懸濁液を吸引濾過後, 濾液を50% MeOH で20 ml にメスアップし, その1 ml を Sep-Pak C18 カートリッジに通導後, MeOH 1 ml で吸着部を溶出した。通過液および MeOH 溶出液を合併し, 40℃の水浴中減圧下濃縮後, 濃縮物を30% MeCN 150 μ l に溶解し, その内20 μ l を HPLC 用試料 (1) とした。同様に, 各々の粉末サンプル1gを, 水 (18 ml) - acetone (2 ml) により抽出し, 10% acetone で20 ml にメスアップし, その1 ml を Sep-Pak C18 カートリッジに通導後, acetone (1 ml) で溶出した。通過液および acetone 溶出液を合併し, 40℃の水浴中減圧下濃縮後, 前述と同様の処理により HPLC 用試料 (2) とした。

含有成分の HPLC 分析

試料溶液を下記の分析条件に従い, 各化合物はピークの面積百分による2点検量線法により定量した。また, 本分析には JASCO Gulliver Gradient System (日本分光, 東京) を用いた。分析条件 A (**1-4**, **5-8** および **10-23** の分析): カラム, Cosmosil

5PE-MS (5 μ m, i. d. 4.6 \times 150 mm) ; カラム温度, 40 $^{\circ}$ C ; 流量, 1.0 ml/min ; 検出波長, 254 nm. 溶出溶媒 (重量比) は MeCN-1% AcOH (5:95) (=A) と MeCN-1% AcOH (60:40) (=B) の2種の溶媒系を, 50分で A/B = 100/0 から 60/40% までグラジェントした. 分析条件 B(5, 9 および 10 の分析): カラム, Cosmosil 5PE-MS (5 μ m, i. d. 4.6 \times 150 mm) ; カラム温度, 40 $^{\circ}$ C ; 流量, 1.0 ml/min ; 検出波長, 280 nm ; 溶出溶媒 (重量比) , MeCN-1% AcOH (5:95) .

第四節 第五章に関する実験

Cimicifugic acid および関連化合物の血管平滑筋に対する作用

実験材料および調整法としては, cimicifugic acid A-C (1-3) , fukinolic acid (4) , fukiic acid (5) , 2-caffeoylpiscidic acid [cimicifugic acid D (6)] および 2-feruloylpiscidic acid [cimicifugic acid E (7)] は, *Cimicifuga simplex* 地下部からの単離・精製品を使用した. Norepinephrine 塩酸塩, ethylene glycol bis(2-aminoethyl eter)tetraacetic acid (EGTA) および acetylcholine chloride は Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より, prazosin 塩酸塩は東京化成工業 (東京) より各々購入した. Nicardipine は, エタノールに溶解し蒸留水で希釈したものを使用した. Prazosin 塩酸塩は, DMSO に溶解後, 蒸留水で希釈した. エタノールと DMSO の組織溶液中の最終濃度は 0.1% であり, 大動脈血管に対しては影響を与えなかった. 他のすべての検体は, 生理食塩水に溶解して使用した. また, すべての化合物濃度は, 組織溶液中の検体最終濃度で表した. また, 実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で表し, データの統計評価は有為差検定として Student's t-test を用い, 危険率 (p) 0.05% 未満を有為差有りとした.

ラットの胸部大動脈血管の単離および実験方法

Wistar 系雄性ラット (体重 250-300 g) を斬首し, 大動脈弓と横隔膜の間の胸部大動脈血管を取り出し, 酸素化された Krebs-Henseleit-Solution (KHS) 溶液 (溶液組成: NaCl, 118.0; KCl, 4.7; NaHCO₃, 25.0; CaCl₂, 1.8; NaH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; glucose, 11.0

mM) に浸した. その大動脈の付着脂肪と結合組織を取り除いた後, 螺旋片標本 (3 \times 20 mm) を作成した. この大動脈血管の内皮を取り除くため, 内皮組織表面を軽く擦り取り, これを十分に酸素化された KHS 10 ml 溶液 (37 $^{\circ}$ C) 中に片方を固定し, もう片方を force-displace transducer (Kohden Co., 東京) に接続した. これを 1 g の静止張力で 1 時間平衡化し, その間 20 分毎に KHS 溶液を更新した. 各々の大動脈は, 1 時間の平衡化の後, 1.0×10^{-7} M の norepinephrine (NE) を前投与し, cimicifugic acid A-C (1-3) , fukinolic acid (4) , cimicifugic acid D (6) および (7) の NE により誘発される大動脈の収縮に対する作用を検討した. NE (1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-7} M) は, 大動脈が最大の変化を示すまで, 累積的に投与した. 一方, 4 または 6 の存在下, NE により誘起される大動脈の収縮を測定するときは, まず検体溶液に大動脈血管を 1 時間曝した後に, NE を投与した. 収縮抑制の作用機序の比較として, caffeic acid (10) (3.0×10^{-4} M) について上記と同様の方法で, 大動脈に対する作用を測定した. Nicardipine 存在下, NE により誘発される大動脈の収縮に対する作用の検討としては, KHS 溶液中の大動脈を nicardipine (1.0×10^{-6} M) で処理し, NE (1.0×10^{-7} M) を加え大動脈の収縮を誘発させた後, 4 (3.0×10^{-4} M) または 6 (3.0×10^{-4} M) を投与し, 大動脈の張力変化を測定した. Prazosin 存在下, K⁺により誘起される大動脈の収縮に対する検討としては, KHS 溶液中の大動脈を prazosin (1.0×10^{-6} M) で処理し, 4 (3.0×10^{-4} M) または 6 (3.0×10^{-4} M) を加え 1 時間後に等張の K⁺ (40 mM) -KHS 溶液に更新し, 大動脈の張力変化を測定した. ROC に対する作用の検討は, 大動脈を Ca²⁺ のチャンネルブロッカーである nicardipine (1.0×10^{-6} M) と 0.01 mM の EGTA を含む Ca²⁺-free KHS 溶液に入れ, NE をその溶液に最終濃度 1.0×10^{-6} M まで加えた. この溶液に 4 (3.0×10^{-4} M) または 6 (3.0×10^{-5} M) を前投与しておき, Ca²⁺ (1.0×10^{-5} - 1.0×10^{-3} M) を累積的に投与し, 張力変化を測定した. VDC に対する作用の検討は, 大動脈を 0.01 mM の EGTA を含んだ Ca²⁺-free の KHS 溶液に入れ, 等張の K⁺ (60 mM) で脱分極させた. この脱分極された KHS 溶液中の大動脈に 4 (3.0×10^{-4} M) または 6 (3.0×10^{-4} M) を前投与しておき, Ca²⁺ (1.0×10^{-5} - 1.0×10^{-3} M) を累積的に投与し,

張力変化を測定した。

Cimicifugic acid C (3) (1.0×10^{-5} – 3.0×10^{-4} M) は, KHS 溶液中の大動脈が最大の応答反応を示すまで, 累積的に投与した。

第五節 第六章に関する実験

Cimicifugic acid A および fukinolic acid の発芽抑制作用

Rosmarinic acid はフナコシ (東京) より購入した。Cimicifugic acid A (1), fukinolic acid (4) は, 第二章で *C. simplex* 地下部より単離したものを用いた。Caffeic acid (10) はナカライテスク (京都) より購入した。α-Amylase と carboxypeptidase A はシグマアルドリッチジャパン (東京) より購入した。発芽抑制作用の対照化合物である sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) は東京化成工業 (東京), α-amylase の対照化合物である acarbose はバイエル薬品 (大阪), carboxypeptidase A の対照化合物である 1,10-phenanthroline はナカライテスク (京都) より各々購入した。

発芽抑制 (植物成長阻害) 作用

検体としての rosmarinic acid, 化合物 1, 4, 10 および 2, 4-D を DMSO あるいは水に溶解し, その 1 ml を濃度が 1.0×10^{-4} – 3.0×10^{-4} M になるように滅菌した 0.8% 寒天培溶液 (ナカライテスク, 京都) 100 ml に希釈した。検体および DMSO (コントロール) を含んだこれらの培溶液を 500 ml の滅菌培養ポットに注入し, 70% エタノールおよび 1% 塩素酸ソーダで滅菌した 20 個の植物種子 [Tables 5-1 (1) および 5-2 (2) に記載の 4 種類] を培地に置き, 9000 ルックスの光照射下, 7 日間培養した。その後, 発根した根の長さを測定し, 検体を添加したものと, 添加しないコントロール (1.00) とを比較し, 50% 植物生長阻害濃度 (IC_{50} 値) を算出した。

α-Amylase 阻害活性および carboxypeptidase A の阻害活性

文献 52–54) に記載した方法により実施した (Tables 7 および 8)。

第六節 第七章に関する実験

実験材料の 59 種のトリテルペノイド 27–85 は, その化学構造の共通性から 5 つのグループに分類された。すなわち, cimicifugoside グループ (group I), shengmanol グループ (group II), hydroshengmanol グループ (group III), cimigenol グループ (group IV) およびその他のグループ (group V) である [Figs. 32 (1) および 32 (2)]。Group I: Cimicifugoside (27) と cimicifugenin (43) は, *Cimicifuga* (*C.*) *simplex* ⁵⁸⁾ から単離した。Actein (28) は *C. racemosa* と *C. simplex* より単離した ⁵⁹⁾。Bugbanoside A (29) と B (30) は両者とも *C. simplex* より単離した ⁶⁰⁾。26-Deoxycimicifugoside (41) ⁶¹⁾ は *C. simplex* と *Actaea spicata* L. より単離した。これらの関連化合物である 31–38 は, 27–30 を MeOH 中 *p*-TsOH で処理して得た ^{59, 60)}。39, 40 および化合物 42 は, 27, 29 および 30 を各々 CrO_3 –pyridine で酸化して得た。真正のアグリコンである 44 と 45 は, 29 と 30 の各々を cellulase 酵素加水分解して得た ¹³⁾。Group II: 23-*O*-Acetylshengmanol 3-*O*-β-D-xylosyl $\xrightarrow{3-1}$ β-D-glucoside (46) ⁶²⁾, 7 β-hydroxy-23-*O*-acetylshengmanol 3-*O*-β-D-xyloside (48) ⁶³⁾ および 23-*O*-acetyl-7,8-didehydroshengmanol 3-*O*-α-L-arabinoside (49) ⁶⁴⁾ は各々 *C. simplex* の地上部より単離した。また, これらのアグリコンである 47, 50 および 25 は, 各々の対応する配糖体を cellulase 酵素加水分解して得た ^{62–64)}。Group III: 7 β-Hydroxy-23-*O*-acetylshengmanol (51), 24-*O*-acetylhydroshengmanol 3-*O*-β-D-xyloside (52), 24-*O*-acetylhy-25-*O*-methylhydroshengmanol 3-*O*-β-D-xyloside (53), 7 β-hydroxy-24-*O*-acetyl-25-*O*-methylhydroshengmanol 3-*O*-β-D-xyloside (54), 1 β-hydroxy-24-*O*-acetyl-25-*O*-methylhydroshengmanol 3-*O*-β-D-xyloside (55) ⁶⁵⁾ および 24-*O*-acetyl-7,8-didehydroshengmanol 3-*O*-β-D-galactoside (56) ⁶⁴⁾ は各々 *C. simplex* の地上部より単離した。また, それら 52–56 の各々のアグリコンである 57–61 は, 各々の対応する配糖体を cellulase または lactase 酵素加水分解して得た ^{64, 65)}。Group IV: 25-*O*-Acetylcimigenol 3-*O*-β-D-xylosyl $\xrightarrow{3-1}$ β-D-glucoside (62) ⁶²⁾, 1 α-hydroxy-25-*O*-acetylcimigenol 3-*O*-β-D-xyloside (64) ⁶⁵⁾, 12 β-hydroxycimigenol 3-*O*-α-L-arabinoside (65) ⁶⁶⁾, 7 β-

hydroxycimigenol (66)⁶³⁾, 7,8-didehydrocimigenol 3-O- β -D-galactoside (69)⁶⁴⁾ および関連化合物 67 と 68 は, 各々 *C. simplex* の地上部より単離した. Cimigenol (75) と 25-O-acetylcimigenol 3-O- β -D-xyloside (63) は *C. simplex*, *C. acerina* および *C. japonica* より単離した⁶⁷⁾. 15-Deoxycimigenol (77) は 65 より誘導した. これらのアグリコンである 70-76 は, 各々の対応する配糖体を cellulase または lactase により酵素加水分解して得た⁶²⁻⁶⁴⁾. Group V: Cimiaceroside (78) は, *C. simplex* および *C. acerina* から単離した⁶⁸⁾. Cimiacerol (79)⁶⁸⁾ と 23-O-methylcimiacerol (80)⁶⁹⁾ は *C. acerina* から単離した. Acerinol (81) と acerinol acetate (82)⁷⁰⁾ は, *C. acerina*, *C. japonica* および *C. simplex* より単離した. 26-O-Methylcimicimol (83) と simplexol (85)⁶⁷⁾ は, 67 から各々誘導した. Isodahurinol (84)⁷¹⁾ は, *C. acerina* から単離した.

マラリア原虫 (Malaria Parasites)

検体として培養熱帯性マラリア原虫 *Plasmodium* (*P.*) *falciparum* FCR-3 株 (ATCC30932) を用いた. *P. falciparum* は, 人赤血球細胞 (Type A) を 5% のヘマトクリットで含む人血清を, RPMI 1640 培地 (Gibco, NY) に 10% になるように添加し, 24 穴培養プレートで保持した⁷²⁾. そのプレートを, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 下, 37°C で培養した.

哺乳動物細胞 (Mammalian Cells)

スクリーニングの細胞はマウス乳癌由来 FM3A 細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank: JCRB, 東京) の野性株である F28-7 株, 培地には ES 培地 (Nissui Pharm., 東京) に熱不活性化した胎児牛血清 (Gibco, NY) を 2% となるように添加したものをを用いた. 培養は, 5% CO₂ 下, 37°C, プラスチックボトル中で行った⁷³⁾.

抗マラリア活性 (*In vitro*)

抗マラリア活性のアッセイは次の手順によった. まず, 59 検体のトリテルペノイド

を DMSO で種々の濃度に希釈した溶液を準備した. 前培養した熱帯性マラリア原虫を初期感染率が 0.5% となるように非感染赤血球で希釈し, 24 穴培養プレートに分注し, 準備した検体の希釈液 10 μ l を添加し, ピペettingを行い溶液を混和した. そのプレートを 37°C, 72 時間培養した (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). 培養後, 各々の検体の抗マラリア活性を評価するため, Giemsa (Merck, Ger.) による薄層塗沫標本を作成し, 光学顕微鏡下で赤血球への感染率を測定した. また, すべての検体は 2 度づつ, ドラックフリーのコントロール培養液と共に測定した. さらに, すべての測定値は最低 2 回の実験値である. 原虫増殖阻害活性値 (EC₅₀ 値) は, 検体を添加したものの感染率およびコントロールの感染率から算出した.

細胞毒性

FM3A 細胞に対する毒性評価法は次のとおりである. 細胞増殖時間は 12 時間であった. 細胞数を 5 \times 10⁴ cells/ml になるように培地で希釈し, その 990 μ l を 24 穴培養プレートにいれ, 水または DMSO でサスペンドした検体 10 μ l を添加した. そのプレートを 37°C, 5% CO₂ 下 48 時間培養した. 各々のウェルについて細胞数を, cell counter CC-108 (東亜メディカル電波, 東京) で測定した. すべての測定値は最低 2 回の実験値である. 50% 細胞増殖阻止濃度 (EC₅₀ 値) は, 検体を添加したものと, 同一の条件で検体を添加しないコントロールとの比較から算出した.

放射性ヌクレオシドのリンパ球細胞への取り込み阻害の測定

マイトージェンは, concanavalin A (Con A) (Sigma-Aldrich, cat. no. C2010, USA), lipopolysaccharide (LSP) (Difco Laboratories, cat. no. 3920-25-2, USA) および phytohemagglutinin (PHA) (Gibco, cat. no. 670-0576AD, NY) を用いた. 放射性ヌクレオシドは thymidine-³H (³H-TdR): spec. act., 5 Bq/m mol および uridine-³H (³H-UdR): spec. act., 27 Bq/m mol (Amersham, USA) を各々用いた. 応答リンパ球は, mouse BDF1 (Japan SLC, Inc., 静岡) male, 8 weeks を用いた. マイトージェン刺激による放射性

ヌクレオシド取込み阻害測定：リンパ球はマイクロプレート (Sumitomo Bakelite, cat. no. MS3096-F, 大阪) で培養した。各ウェルを Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) , LSP ($10 \mu\text{g/ml}$) または 1% PHA を含んだ培地 $200 \mu\text{l}$ で細胞数が $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ となるように希釈し、種々の濃度の検体を添加した。これらを 5% CO_2 下、 37°C で 48 時間培養し、 $^3\text{H-TdR}$ ($0.5 \mu\text{Bq}$) あるいは $^3\text{H-UdR}$ ($0.5 \mu\text{Bq}$) を各ウェルに添加した。さらに 18 時間培養後、multiple semi-automated cell harvester (Labo Mash Co., 東京) で収納し、リンパ球をガラスフィルターで濾取・乾燥後、ガラスフィルター [10 ml of Econoflor-2 (Packard Institute, USA)] 上の高分子の放射活性を、液体シンチレーションカウンタ (Aloka Co., 東京) で測定した。放射ラベルされた TdR あるいは UdR の取込み阻害活性は、3 回の繰り返し実験により決定した。上記と同様の操作で、検体を加えずマイトージェンのみを加えたものおよび加えないものを対照とし 50% 取込み阻害濃度 (IC_{50} 値) を算出した。

$^3\text{H-TdR}$ の取り込み測定

応答リンパ球細胞として、健常人から得た peripheral blood lymphocyte (human PBL) を用いた。それぞれのウェルを 1% PHA を含んだ培地 $200 \mu\text{l}$ で細胞数が $2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ となるように希釈し、種々の濃度の検体を添加した。これらを 5% CO_2 下、 37°C で 102 時間培養後、 $^3\text{H-TdR}$ ($0.5 \mu\text{Bq}$) を各ウェルに添加した。さらに 18 時間培養後、 $^3\text{H-TdR}$ の細胞への取込みを上記と同様の方法で測定した。また、実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で表し、データの統計評価は有為差検定として Student's t-test を用い、危険率 (p) 0.05% 未満を有為差有りとした。

MTT アッセイ

応答リンパ球細胞は、mouse BDF1 splenocyte を用いた。各ウェルを Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) を含んだ培地 $200 \mu\text{l}$ で細胞数が $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ となるように希釈し、種々の濃度の検体を添加した。これらを 5% CO_2 下、 37°C で 72 時間培養後、 $25 \mu\text{l}$ MTT [3-

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (同仁化学, cat. no. 341-01823, 東京) 溶液 (6 mg/ml) を各ウェルに加え、上記と同じ条件で更に 4 時間培養した。培養後、上澄みを取り除き、生成したホルマザン (formazan) を各ウェルに 20% SDS (sodium dodecyl sulfonate) - 0.02 N HCl 溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、 37°C 、24 時間保持して溶解させた。生細胞数に比例して生成した formazan を、570 nm のフィルターを装着したイムノリーダー NJ-2001 (Inter Med., USA) を用い、Tim Mosmann らの方法で吸光光度 (OD) を測定した⁷⁴⁾。添加したトリテルペノイド濃度と吸光強度の相関より、50% の細胞増殖阻止濃度 (IC_{50} 値) を算出した。

参考文献

- 1) 厚生省告示第 254 号, 第十三改正日本薬局方第一追補, 生薬総則・第二部医薬品各条 37 頁, 1997 年 12 月 26 日.
- 2) a) 北村四郎, 村田源共著, “原色日本植物図鑑 [中]”, 保育社, 大阪, p. 356 (1966); b) 大井次三郎著, “日本植物誌”, 至文堂, 東京, p. 218 (1965).
- 3) 中国科学院植物研究所主編, “中国高等植物図鑑” 第一册, 科学出版社, 北京, p. 662 (1972).
- 4) 南京药学院編, “药材学” 勸華文化服務社, 九竜, p. 360 (1969).
- 5) 刈米達夫著, “世界の民間薬” 廣川書店, 東京, p. 156 (1972).
- 6) 難波恒雄著, “和漢薬百科図鑑 [I]” 保育社, 大阪, pp. 30—32 (1993).
- 7) 陳 存仁著, “図説漢方医薬事典 [I]” 講談社, 東京, pp. 106—109 (1982).
- 8) 鈴木真海著, “国譯本草綱目” 第十三册, 春陽堂蔵版, pp. 302—310 (1977).
- 9) 中山医学院編, 神戸中医学研究会訳編, “漢薬の臨床応用” 医歯薬出版, 東京, pp. 47—50 (1980).
- 10) Yamahara J., Kobayashi M., Kimura H., Miki K., Kozuka M., Sawada T., Fujimura H., *Natural Medicines*, **39**, 80—84 (1985).
- 11) Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1940—1944 (1972).
- 12) Shibata M., Yamatake Y., Amagaya Y., Fukushima M., *Yakugaku Zasshi*, **95**, 539—546 (1975).
- 13) Ito M., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 580—583 (1976).
- 14) a) Sakai S., Ochiai H., Hirabayashi T., Terasawa K., *J. Traditional Medicines*, **12**, 394—395 (1995); b) Hirabayashii T., Ochiai H., Sakai S., Nakajima K., Terasawa K., *Planta Medica*, **61**, 221—226 (1995).
- 15) Li J. X., Kadota S., Li H. Y., Miyahara T., Namba T., *J. Traditional Medicines*, **13**, 50—58 (1996).

- 16) a) Memmi H., Kitame F., Ishida N., Kusano G., Kondo Y., Nozoe S., *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 339—349 (1979); b) Hemmi H., Kusano G., Ishida N., *ibid.*, **3**, 636—642 (1980); c) Hemmi H., Kitame F., Ishida N., Kusano G., Kondo Y., *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*, **11**, 61—66 (1978).
- 17) a) Hirabayashi T., Ochiai H., Sakai S., Nakajima K., Terasawa K., *Planta Medica*, **61**, 221—226 (1995); b) Shiotani Y., Terasawa K., Miyashiro H., Hattori M., Komatsu K., Li X. B., Namba T., *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **10**, 110—117 (1993); c) Shibata M., Sakurai N., Onoda M., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 911—915 (1977).
- 18) 小枝 守, 桜井信子, 野口真里子, 井上隆夫, 永井正博, 日本薬学会第 113 年会, 大阪, 講演要旨集 2, p. 163 (1993).
- 19) Ito M., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 580—583 (1976).
- 20) a) 難波恒雄, 小松かつ子, 李 曉波, 日本生薬学会第 40 年会, 大阪, 講演要旨集, p. 127 (1993); b) Komatsu K., Li X. B., Yamaji S., Namba T., *Natural Medicines*, **50**, 222—231 (1996); c) Shibata M., Nagai M., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 850—865 (1996).
- 21) Kusano A., Shibano M., Kusano G., Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2078—2085 (1996), and references therein.
- 22) Yoshihara T., Ichihara A., Sakamura S., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3809—3812 (1971).
- 23) Sakamura S., Yoshihara T., Toyoda K., *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1795—1797 (1969).
- 24) Heller W., Tamm C., *Helv. Chim. Acta*, **58**, 974—979 (1975).
- 25) Matsumoto T., Hidaka K., Nakayama T., Fukui K., *Chem. Lett.*, pp.1—4 (1972).
- 26) a) Otani T., Ae N., Tanaka H., *Soil Sci. Plant Nutr.*, **42**, 553—560 (1996); b) Ae N., Arihara J., Okada K., Yoshihara T., Johansen C., *Science*, **248**, 477—480 (1990).
- 27) a) Sakamura S., Yoshihara T., Toyoda K., *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1915—1921 (1973); b) Heller W., Tamm C., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 1766—1784 (1974).
- 28) Freer P.C., Clover A.M., *Am. Chem. J.*, **25**, 390 (1901).

- 29) Baba K., Hata K., Kimura Y., Matuyama Y., Kozawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2565—2570 (1981).
- 30) Tjarks L. W., Spencer G. F., Seest E. P., *J. Nat. Prod.*, **52**, 655—656 (1989).
- 31) a) Wagner H., Chari V. M., Sonnenbichler J., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1799—1801 (1976); b) Nakano K., Maruhashi A., Nohara T., Tomimatsu T., Imamura N., Kawasak T., *Phytochemistry*, **22**, 1249—1251 (1983); c) Bruce A. B., Nicholls K. W., *Am. J. Bot.*, **73**, 204—213 (1986).
- 32) Ternai B., Markham K. R., *Tetrahedron*, **32**, 565—568 (1976).
- 33) Ishii M., Uemoto S., Fujieda K., Nonaka M., Shoyama Y., Miyahara Y., Nishioka I., *Phytochemistry*, **18**, 1211—1213 (1979).
- 34) 北川 勲, 三川 潮, 庄司順三, 滝戸道夫, 友田正司, 西岡五夫共著, “生薬学” 廣川書店, 東京, p. 49 (1994).
- 35) a) Iriye R., Furukawa K., Nishida R., Kim C., Fukami H., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **56**, 1773—1775 (1992); b) Y. Yaoita, M. Kikuchi, *Phytochemistry*, **37**, 1773—1774 (1994).
- 36) Ito M., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 580—583 (1976).
- 37) Genazzani E., Sorrentio L., *Nature (London)*, **194**, 544—545 (1962).
- 38) Chang U. K., Kim J. Y., *Yongnam Taehakkyo Chonyonmul Hwahak Yonguso Yongu Pogo*, **4**, 55—58 (1997) [*Chem. Abstr.*, 89, 16724n (1978)].
- 39) Nagai M., Noguchi M., Iizuka T., Otani K., Kamata K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 228—232 (1996).
- 40) Legan E., Chernow B., Parrillo J., Roth B. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **110**, 389—390 (1985).
- 41) Somlyo A. V., Bond M., Somlyo A. P., Scarpa A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 5231—5235 (1985).
- 42) Meisheri K. D., Van Breemen C., *J. Membr. Biol.*, **59**, 19—25 (1981).

- 43) Escubedo E., Camarasa J., Adzet T., *IRCS Med. Sci.*, **14**, 1196—1197 (1986).
- 44) Peake P. W., Pussell B. A., Martyn P., Timmermans V., Charlesworth J. A., *Int. J. Immunopharmacol.*, **13**, 853—857 (1991).
- 45) Yokozawa T., Zhou J. J., Oura H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Phytoether. Res.*, **9**, 105—109 (1995).
- 46) Binutu O. A., Adesogan K. E., Okogun J. I., *Planta Med.*, **62**, 352—353 (1996).
- 47) Robinson W. E. Jr., Reinecke M. G., Abdel-Malek S., Jia Q., Chow S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **93**, 6326—6331 (1996).
- 48) Chen Y. F., Tsai H. Y., Wu T. S., *Planta Medica*, **61**, 2—8 (1995).
- 49) Yamada J., Tomita Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 328—329 (1996).
- 50) Mallik M. A. B., Puchala R., Grosz F. A., *J. Chem. Ecol.*, **20**, 957—967 (1994).
- 51) He X., Yang P., *Shanxi Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **19**, 60—62 (1996). [*Chem. Abst.*, **124**, No. 21, 282444a (1996).]
- 52) Muro C., Yasuda M., Sakagami Y., Yamada T., Tsujibo H., Numata A., Inamori Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1368—1371 (1996).
- 53) Truschet E., Frommer W., Junge B., Muller L., Schmidt D. D., Wingender W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 744—761 (1981).
- 54) Petro P. H., *Methods Enzymol.*, **19**, 460 (1970).
- 55) Kanzaki K., Kawabata C., Noda K., *Seed Sci. Res.*, **3**, 287—292 (1993).
- 56) Ranki H., Mendez-Lozano J., Sopanen T., *Physiol. Plant.*, **91**, 90—96 (1994).
- 57) Annette M. G., Joanne M. U., "Purine and Pyrimidine Metabolism in Man" VIII, Edited by Sahota A. and Taylor M., *Plenum Press*, New York, pp. 493—497 (1995).
- 58) Kusano G., Hojo Y., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3182—3189 (1977).
- 59) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 467—472 (1998).

- 60) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1001—1007 (1998).
- 61) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, submitted.
- 62) Kusano A., Shibano M., Kitagawa S., Kusano G., Nozoe S., Fushiya S., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1940—1943 (1994).
- 63) Kusano G., Idoji M., Sogoh Y., Shibano M., Kusano A., Iwashita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1106—1110 (1994).
- 64) Kusano A., Shibano M., Kusano G., Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2078—4085 (1996).
- 65) Kusano A., Shibano M., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 167—172 (1996).
- 66) Kusano A., Shibano M., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1167—1170 (1995).
- 67) Kusano G., Kondo Y., Takemoto T., *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*, **9**, 21—27 (1975).
- 68) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Okuyama T., Kusano G., *Heterocycles*, **48**, 1003—1013 (1998).
- 69) Kusano G., Nozoe S., *Heterocycles*, **20**, 1951—1952 (1983).
- 70) Kusano G., Uthida F., Murakami Y., Sakurai N., Takemoto T., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 321—325 (1976).
- 71) Kusano G., Murakami Y., Sakurai N., Takemoto T., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 82—85 (1976).
- 72) Trager W., Jesen J. B., *Science*, **193**, 673—675 (1976).
- 73) Yoshioka A., Tanaka S., Hiraoka O., Koyamada Y., Hirota Y., Ayusawa D., Sen T., Garret C., Wataya Y., *J. Biol. Chem.*, **262**, 8235—8241 (1987).
- 74) Mosmann T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55—63 (1983).

